



Skript zum Praktikum

„Regulation der Wasserausscheidung durch die Niere“

UNIVERSITÄT LEIPZIG
MEDIZINISCHE FAKULTÄT
CARL-LUDWIG-INSTITUT FÜR PHYSIOLOGIE

VERSION WS 2021/22

Einführung

Stichwörter zur Vorbereitung auf das Praktikum:

Hypotone bzw. isotone Hyperhydratation, Wasserbilanz, Volumenregulation, Osmoregulation zentrale und periphere Osmorezeptoren, Osmolarität und Osmolalität, Renin-Angiotensin-Aldosteron-System, ADH-Freisetzung und -Wirkung, Clearance, Inulin, Kreatinin.

Die Hauptfunktion der Niere besteht in der Kontrolle der Homöostase. Als wichtige Teilaufgaben gelten dabei die Regulation des Volumens und der Osmolalität der extrazellulären Flüssigkeit. Die Mechanismen der Volumenregulation sind gleichzeitig Bestandteil der Langzeitregulation des arteriellen Blutdruckes.

1 Wassertrinkversuch nach VOLHARD

Nach Aufnahme einer größeren Menge destillierten Wassers (1l) kommt es mit einer Latenz von ca. 30 Minuten für die folgenden 2 – 3 Stunden zu einer gesteigerten Diurese (Wasserdiurese). Dieser Effekt kann durch eine nach dem Ansprechen von Osmo- und Volumenrezeptoren verminderte ADH-Ausschüttung erklärt werden. Trinkt man die gleiche Menge blutisotonische Kochsalzlösung, setzt die Steigerung der Ausscheidung langsamer ein und ist geringer.

Die Arbeitsgruppen zweier Tische tauschen jeweils untereinander die Messergebnisse aus. Jede Gruppe stellt einen Probanden. Vor Beginn der Flüssigkeitsaufnahme entleeren die Probanden ihre Harnblasen und es werden Dichte, Osmolalität und Chloridgehalt des Urins bestimmt.

Ein Proband trinkt einen Liter vollentsalztes (VE-)Wasser, während der andere einen Liter isotonische Kochsalzlösung zu sich nimmt. Vom Zeitpunkt der Flüssigkeitsaufnahme beginnend wird jeweils im Abstand von 15 min die Blase entleert und Volumen, Dichte, Osmolalität und Chloridionenkonzentration des ausgeschiedenen Urins bestimmt. Die Messungen sind bis 75 min nach der Flüssigkeitsaufnahme fortzusetzen.

1.1 Volumenbestimmung:

Die Volumenbestimmung erfolgt mit Messgefäßen entsprechenden Fassungsvermögens:
für Volumina > 50 ml im Messbecher (Sammelgefäß)
für Volumina < 50 ml im Messzylinder.

1.2 Dichtebestimmung:

Die Dichte wird durch „Spindeln“ mit einem Aräometer gemessen. Dazu werden in einem 50ml Messzylinder 30 – 40 ml Flüssigkeit benötigt, da das Aräometer in der Flüssigkeit frei schweben muss. Sollte die Menge des Urins dafür nicht ausreichen, ist eine entsprechende Verdünnung mit VE-Wasser vorzunehmen (Mischungsverhältnis 1:1; 1:2; 1:3). Die Dichte der Flüssigkeit, in die das Aräometer getaucht ist, entspricht dem Wert, bei dem die Skala des Aräometers den untere Flüssigkeitsmeniskus schneidet. Die abgelesene Dichte ist unter Berücksichtigung der Verdünnung zu korrigieren. Es kann vorausgesetzt werden, dass sich die Dichte von Mischungen zwischen Urin und reinem Wasser linear mit der Verdünnung ändert.

Mischungsverhältnis 1:n $\rho_{Urin} = (n + 1) \cdot \rho_{misch} - n \cdot \rho_{H_2O}$

Die Dichte des Wassers bei verschiedenen Temperaturen ist der Tabelle 1 zu entnehmen.

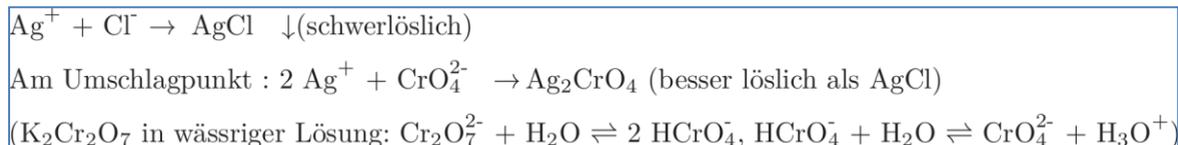
Temperatur [°C]	Dichte [g/cm ³]
0 (Eis)	0,918
4	1,000
16	0,999
21	0,998
25	0,997
29	0,996
32	0,995
35	0,994
38	0,993
95	0,958

Tabelle 1: Dichte des Wassers in Abhängigkeit von der Temperatur

1.3 Argentometrische Bestimmung der Chloridionenkonzentration

Eine kleine Menge der Urinprobe wird durch einen Papierfilter mit Aktivkohle filtriert. Für die weiteren Proben wird die Filtrationsanordnung wieder benutzt. Man beachte jedoch, dass bei der nachfolgenden Probe die vorangegangene vollständig aus dem Filter gelaufen ist. Die Filtration mit Aktivkohle dient dem Entfernen von Purinen, die die anschließende Chloridbestimmung verfälschen würden.

Fällungstiteration: 10 Tropfen des Filtrats werden mittels einer Pasteurpipette in ein Reagenzglas gegeben und 1 Tropfen Kaliumdichromatlösung zugefügt. Unter Schütteln wird 2,9%ige Silbernitratlösung so lange zugetropft bis die Farbe des Niederschlags von weißlich-gelb nach rotbraun umschlägt.



Die Anzahl der Tropfen entspricht dem Chloridgehalt der Probe in g/l. Diese Werte werden in mmol/l umgerechnet (Molmasse des Chlorids: 35,5 g/mol). Die Stoffmenge an NaCl in mmol ergibt sich dann aus der Chloridkonzentration und dem ausgeschiedenen Urinvolumen zum jeweiligen Zeitpunkt. Sinkt der Chloridgehalt unter 3 g/l wird zur Steigerung der Messgenauigkeit die vorgelegte Anzahl von Tropfen des Urin-Filtrats so lange in Zehnerschritten erhöht, bis die Anzahl der Tropfen der Silbernitratlösung bis zum Farbumschlag über 3 liegt oder die Anzahl der vorgelegten Tropfen Urin 30 ist.

1.4 Bestimmung der Osmolalität

Die Osmolalität ist ein Maß für die Anzahl osmotisch aktiver Teilchen in einem Kilogramm Lösungsmittel. Die Messung der Urinosmolalität lässt Rückschlüsse auf die Leistungsfähigkeit der Niere zu. Die Osmolalität im Urin kann zwischen 50 und 1200 mosmol/kg betragen, während die Osmolalität im Plasma normalerweise zwischen 290 und 300 mosmol/kg gehalten wird.

Zur Bestimmung der Osmolalität werden 50 µl Urin (Entnahme erfolgt mit einer µl-Pipette aus dem Messbecher) sofort nach der Gewinnung in ein Probengefäß pipettiert und nach Gruppen sortiert in den Probensammler des Messgerätes (OSMOMAT auto) gestellt. Die Messung erfolgt für alle Gruppen gemeinsam und hat einen hohen Zeitbedarf. Die Messwerte sind nach der Messung auf dem Ausdruck unter der entsprechenden Gruppe abzulesen und anschließend graphisch nach der Zeit in Abb. 2 darzustellen.

2 Kreatininbestimmung im Blut

Ein zentraler Parameter zur Beurteilung der Filtrationsfähigkeit der Niere ist die glomeruläre Filtrationsrate (GFR). Sie ist das pro Zeiteinheit gebildete Filtratvolumen beider Nieren. Diese diagnostisch wichtige Messgröße ist nicht direkt messbar, sondern genau nur mit Hilfe der Bilanzmethode auf Basis der Massenerhaltung (Fick'sches Prinzip) zu ermitteln. Die GFR ist danach bestimmbar mit einer Substanz, die (1.) frei filtrierte, (2.) tubulär weder resorbiert noch sezerniert und (3.) nicht metabolisiert wird. Kreatinin als Endprodukt des Muskelstoffwechsels erfüllt diese Bedingungen annähernd (es unterliegt neben freier Filtration noch einer geringen zusätzlichen Sekretion) und besitzt den großen Vorteil, dass es im Organismus natürlich vorkommt und unter normalen Bedingungen mit nahezu konstanter Bildungsrate entsteht. Bei stationärer Kreatininkonzentration im Plasma $[Kreat]_p = const.$ gilt: Bildungsrate = Ausscheidungsrate, und damit:

$$GFR \cdot [Kreat]_p = \dot{V}_U \cdot [Kreat]_U = const.$$

\dot{V}_U = Harnzeitvolumen

$[Kreat]_U$ = Kreatininkonzentration im Harn

Zwischen GFR und $[Kreat]_p$ besteht eine inverse Beziehung, die graphisch als Hyperbel dargestellt werden kann. Über diesen Zusammenhang ist es möglich, aus der Höhe des Plasma-Kreatininspiegels auf die Funktionsfähigkeit der Nieren zurückzuschließen. Bei der Verwendung des Plasma-Kreatininspiegels als Screening-Test ist allerdings nachteilig, dass die Plasma-Konzentration erst bei deutlicher Abnahme der GFR sichtbar ansteigt (sog. blinder Bereich). Kleinere Abweichungen von den Normwerten lassen sich besser mit der Kreatinin-Clearance auf der Basis obiger Beziehung unter Benutzung des 24h-Sammelurins erfassen.

Durchführung:

Die Kreatininbestimmung erfolgt im Vollblut von freiwilligen Probanden. Nach Einweisung (gegen Unterschrift) durch den Saalassistenten wird mit einer Kapillare ein bestimmtes Volumen (32 µl) Kapillarblut aus der Fingerbeere bzw. dem Ohrläppchen entnommen und die Probe auf einen Teststreifen aufgetragen. Mit Hilfe enzymatischer Reaktionen wird die Bildung eines Farbstoffes reflexionsphotometrisch (Reflotron) automatisch gemessen. Das Ergebnis wird nach 2 min wahlweise in mg/dl oder µmol/l angezeigt und mit den Normwerten verglichen.

Protokoll und Aufgaben Niere

Datum:

Name:

Vorname:

Kursgruppe:

1. Auswertung und Aufgaben zum Wassertrinkversuch nach VOLHARD

1.1. Berechnen Sie die in jeder Probe enthaltene Chloridkonzentration und NaCl-Menge in mmol (Stoffmenge!) und tragen Sie die Werte in Tab. 3 und 4 ein. Die ausgeschiedenen Urinvolumina und die NaCl-Teilmenen werden über den Versuchszeitraum addiert und in Tab. 2 übernommen. Berechnen Sie für den NaCl-Probanden den ausgeschiedenen NaCl-Anteil in % der aufgenommenen NaCl-Menge (Tab.2). Anmerkung: Die Molmasse für Kochsalz beträgt 58,5 g/mol. Die Kochsalzmenge ergibt sich als Produkt aus Stoffmengenkonzentration und Volumen der Probe.

1.2. Für die vier ermittelten Größen (Volumen, Dichte, Chloridionenkonzentration und Osmolalität) sind Diagramme anzufertigen (Abb. 1), die die Werte der jeweiligen Probanden der VE-Wasser- und Kochsalzlösungs-Gruppe zum jeweiligen Zeitpunkt enthalten.

1.3.

	VE-H ₂ O	NaCl
Aufgenommene Flüssigkeitsmenge in l	1	1
Ausgeschiedene Flüssigkeitsmenge in l	Summe aus Tab. 3	Summe aus Tab. 4
In % der aufgenommenen Flüssigkeitsmenge	Berechnen	Berechnen
Aufgenommene NaCl-Menge in mmol	—	Berechnen
Ausgeschiedene NaCl-Menge in mmol	Summe aus Tab. 3	Summe aus Tab. 4
In % der aufgenommenen NaCl-Menge	—	Berechnen

Tabelle 2: Kochsalzmengen der Versuchsperson

Ausgangswerte VE-H ₂ O	
Dichte	g/cm ³
Cl ⁻	mmol/l
Osmolalität	mosmol/kg

VE-H ₂ O						
t [min]	V [ml]	ρ [g/cm ³]	Clorid Bestimmung: Tropfenanzahl Silbernitratlösung/ Tropfenanzahl Urinfiltrat	Cl ⁻ [mmol/l]	NaCl [mmol]	Osmolalität [mosm/kg]
15						
30						
45						
60						
75						
Summe		—	—	—		—

Tabelle 3: Daten der Versuchsperson der VE-Wasser-Gruppe

Ausgangswerte NaCl	
Dichte	g/cm ³
Cl ⁻	mmol/l
Osmolalität	mosmol/kg

Isotone Kochsalzlösung						
t [min]	V [ml]	ρ [g/cm ³]	Clorid Bestimmung: Tropfenanzahl Silbernitratlösung/ Tropfenanzahl Urinfiltrat	Cl ⁻ [mmol/l]	NaCl [mmol]	Osmolalität [mosm/kg]
15						
30						
45						
60						
75						
Summe		—	—	—		—

Tabelle 4: Daten der Versuchsperson der isotonischen Kochsalzlösungs-Gruppe.

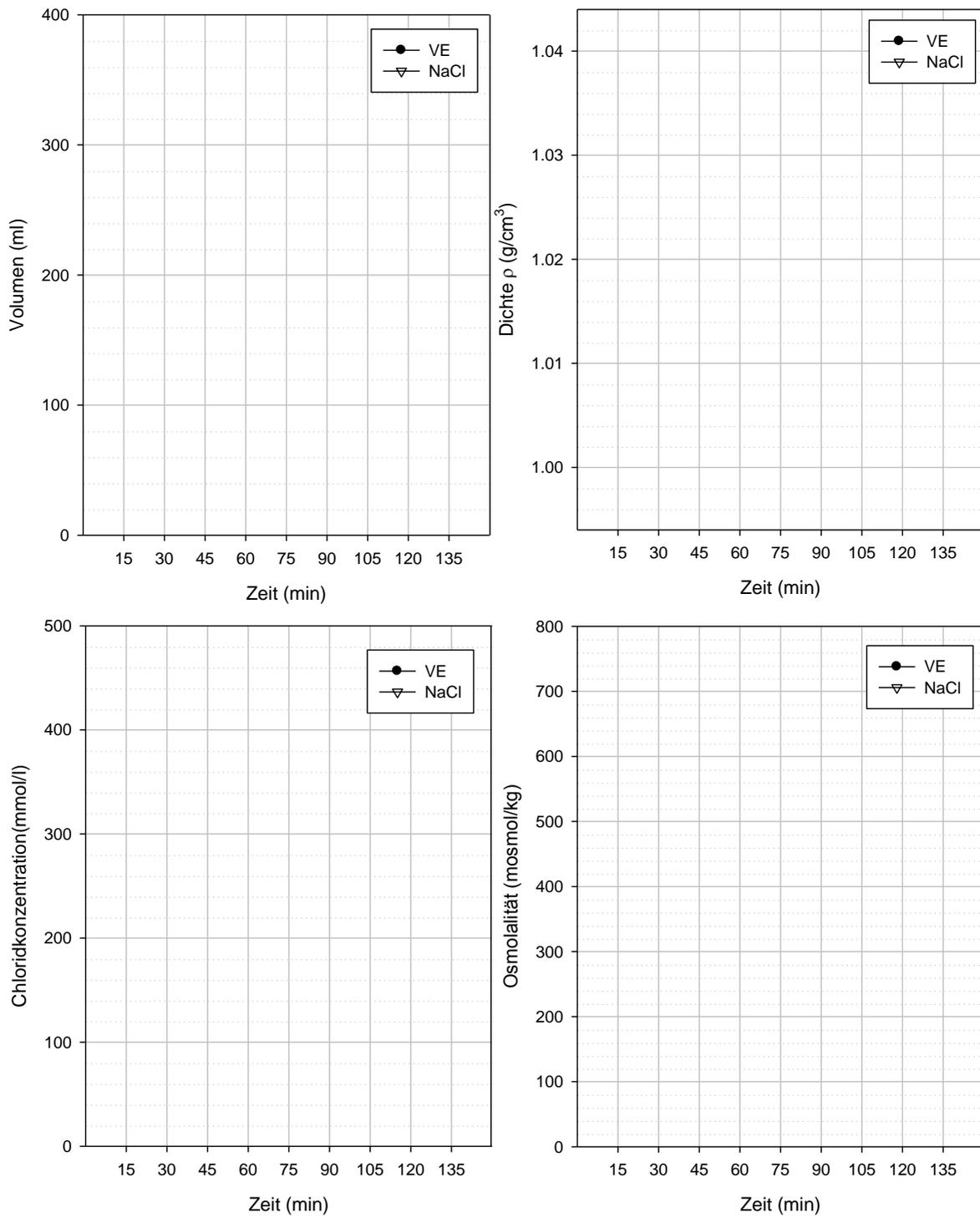


Abbildung 1 Graphische Darstellung der ermittelten Parameter beider Gruppen.

1.4. Beschreiben sie kurz die angefertigten Graphen (Abb. 1) hinsichtlich Gemeinsamkeiten und Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen.

ANTWORT:

1.5. Begründen Sie den unterschiedlichen Verlauf der zu bewertenden Parameter hinsichtlich:

- hypo- und isotoner Hyperhydratation
- Volumensensoren und Osmorezeptoren (Lage, Funktionsweise)
- beteiligten Hormonen (z.B. ADH, ANP, RAAS, Gauer-Henry-Reflex)
- der physiologischen Regulationswege, welche in beiden Gruppen aktiv sind und welche nicht

ANTWORT:

2. Auswertung und Aufgaben Kreatininbestimmung

- 2.1. Übernehmen Sie die Kreatininkonzentrationen aller Probanden in Ihr Protokoll und vergleichen Sie die Meßwerte von Frauen und Männern mittels eines Mann-Whitney-U-Test (Tab. 5). Ist die Kreatininkonzentration im Blut bei Frauen und Männern signifikant unterschiedlich?

ANTWORT:

Statistische Auswertung der Kreatininmessung (Mann-Whitney-U-Test)

Für den statistischen Signifikanztest stellen Sie zuerst die Null-Hypothese H_0 und die Antithese H_1 auf:

H_0 : Die Messwerte für Frauen und Männer unterliegen der gleichen Verteilung und unterscheiden sich nicht signifikant.

H_1 : Die Messwerte für Frauen und Männer unterliegen verschiedenen Verteilungen, wobei die Lage der Verteilung für die Messwerte der Männer bei größeren Werten ist.

Allgemein gilt: Für den Test werden die Messwerte in einer Zahl, der sogenannten Teststatistik U zusammengefasst. Der Wert von U errechnet sich aus der Zahl der „Ereignisse“ und der Größe der jeweiligen gegeneinander getesteten Gruppen. Anschließend wird der errechnete U-Wert mit einem sogenannten „kritischen Wert“ verglichen, der wiederum ebenso von der Gruppengröße und dem festgelegten Signifikanzniveau abhängt (Wahrscheinlichkeit, fälschlicherweise die Nullhypothese anzulehnen; auch „statistischer Fehler 1. Art“ oder „ α “, üblicherweise 0.05). Liegt der errechnete U-Wert unter dem kritischen Wert, dann wird die Nullhypothese H_0 abgelehnt.

Konkret errechnen Sie für das Praktikumsbeispiel den U-Wert wie folgt:

Vergleichen Sie den Messwert jeder Probandin mit dem Messwert jedes Probanden. Dazu übernehmen Sie die Messwerte in die Tabelle 5 (neben den Probandinnen $F_1, F_2 \dots$, und unter den Probanden $M_1, M_2 \dots$). Anschließend stellen Sie die Zahl der „Ereignisse“ fest (zu testende Hypothese H_1 : Männer haben höhere Messwerte als Frauen): Falls der männliche Kreatininwert größer als der weibliche ist, markieren Sie das Tabellenfeld mit einem X. Aus der Anzahl der Markierungen ergibt sich die Teststatistik U, und mittels Statistiksoftware wird unter Berücksichtigung der Anzahl der Probandinnen und Probanden U mit dem kritischen Wert von U verglichen sowie die Überschreitungswahrscheinlichkeit p berechnet. P gibt die Wahrscheinlichkeit an, mit der die festgestellte Ereignishäufigkeit unter Annahme der Nullhypothese H_0 (Messwerte von Frauen und Männern sind gleich) zustande kommen kann. Um die Nullhypothese abzulehnen sollte p deshalb kleiner sein als die vorgegebene Irrtumswahrscheinlichkeit $\alpha = 0.05$. Ist $p > \alpha$ kann H_0 nicht abgelehnt werden und man begibt sich wegen der fehlenden statistischen Aussage in die „Nacht der angenommenen Hypothese“ (nach Prof. Dr. K. Gerald van den Boogaart, Statistiker), denn es bleibt zu klären, ob:

- H_0 tatsächlich richtig ist oder
- H_1 wegen fehlender Teststärke fälschlicherweise abgelehnt wurde (stat. Fehler 2. Art)

		Männer									
Frauen	Kreatinin	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	M8	M9	
F1											
F2											
F3											
F4											
F5											
F6											
F7											
F8											
F9											
F10											
F11											
F12											
F13											
F14											
Anzahl Frauen $N_F =$											
Anzahl Männer $N_M =$											
Anzahl Markierungen $U =$											
Überschreitungswahrscheinlichkeit $p =$											
Ist $p < \alpha$? mit $\alpha = 0.05$		H_0 wird abgelehnt/angenommen!									

Tabelle 5: Mann-Whitney-U-Test (Kreatinin in mg/dl)

2.2. Warum ist eine erhöhte Plasma-Kreatininkonzentration ein wesentlicher Indikator einer eingeschränkten Nierenfunktion?

ANTWORT:

2.3. Berechnen Sie unter Verwendung der empirischen Cockcroft-Gault-Formel ihre glomeruläre Filtrationsrate GFR (in ml/min; Kreatinin-Clearance).

Cockcroft-Gault-Formel¹:

$$\text{Frauen: } GFR_{KR} = 0,85 \cdot \frac{(140 \text{ Jahre} - \text{Alter [Jahre]}) \cdot \text{Gewicht [kg]} \cdot \text{mg} \cdot \text{ml}}{72 \cdot S_{Kr} \left[\frac{\text{mg}}{\text{dl}} \right] \cdot \text{Jahre} \cdot \text{kg} \cdot \text{dl} \cdot \text{min}}$$

$$\text{Männer: } GFR_{KR} = \frac{(140 \text{ Jahre} - \text{Alter [Jahre]}) \cdot \text{Gewicht [kg]} \cdot \text{mg} \cdot \text{ml}}{72 \cdot S_{Kr} \left[\frac{\text{mg}}{\text{dl}} \right] \cdot \text{Jahre} \cdot \text{kg} \cdot \text{dl} \cdot \text{min}}$$

GFR_{KR} in ml/min, Alter in Jahre, Gewicht in kg und S_{Kr} in mg/dl

ANTWORT: GFR= ml/min

¹ Cockcroft DW, Gault MH.: Prediction of creatinine clearance from serum creatinine. Nephron. 1976;16(1):31-41