

**Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik I  
der Universität Würzburg**

**Direktor: Prof. Dr. med. S. Frantz**

**Der Einfluss der Betablocker Nebivolol und Metoprolol auf das  
ischämische akute Nierenversagen**

**Inaugural – Dissertation**

**zur Erlangung der Doktorwürde der**

**Medizinischen Fakultät**

**der**

**Julius-Maximilians-Universität Würzburg**

**vorgelegt von**

**Otto Sebastian Schloßer**

**aus Rosenheim**

**Würzburg, April 2018**



**Referent: Priv.-Doz. Dr. Reinhard Schneider**

**Korreferent: Prof. Dr. A. Friebe**

**Dekan: Prof. Dr. Matthias Frosch**

**Tag der mündlichen Prüfung: 30.4.2019**

**Der Promovend ist Arzt.**

*Au crépuscule du soir.*

## Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung.....	1
1.1. Das akute Nierenversagen.....	1
1.1.1. Definition, Ätiologie und Einteilung .....	1
1.1.2. Epidemiologie .....	3
1.1.3. Klinischer Verlauf und Therapie.....	4
1.2. Pathophysiologie des akuten Nierenversagens .....	6
1.2.1. NO, iNOS und eNOS im ANV .....	9
1.2.2. Das ANV als entzündlicher Prozess .....	9
1.2.3. Störung der Transportprozesse im ANV .....	11
1.3. Die Renale Blutversorgung .....	13
1.4. Der Einfluss von Metoprolol und Nebivolol auf das ischämische ANV	15
1.4.1. Pharmakologie von Nebivolol .....	16
1.4.2. Pharmakologie von Metoprolol .....	17
1.4.3. Betarezeptoren, das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System und der Einfluss des Sympathikus auf die Niere.....	17
1.5. Arbeitshypothese .....	20
2. Material und Methoden .....	22
2.1. Versuchstiere .....	22
2.2. Induktion des ischämischen akuten Nierenversagens.....	22
2.3. Folgeingriff und Entnahme von Organen, Blut und Urin .....	24
2.4. Einteilung der Versuchstiere in Gruppen.....	26
2.5. Bestimmung der Inulin-Clearance .....	27
2.6. Bestimmung der PAH-Clearance .....	29
2.7. Real-time RT-PCR .....	30
2.8. Statistik.....	32

3. Ergebnisse.....	33
3.1. Evaluation der globalen Nierenleistung nach ischämischem ANV .....	33
3.1.1. Glomeruläre Filtrationsrate .....	33
3.1.2. Renaler Plasmafluss.....	35
3.2. Expression einzelner Gene nach ischämischem ANV.....	36
3.2.1. iNOS und eNOS .....	36
3.2.2. MCP 1 und Il-1 $\beta$ .....	39
3.2.3. OAT1 und OAT3.....	41
4. Diskussion .....	44
4.1. Methoden .....	44
4.2. Dosierung der Medikamente .....	45
4.3. Die Nierenfunktion nach ANV und Einsatz der Betablocker Nebivolol oder Metoprolol .....	46
4.4. Veränderungen der iNOS und eNOS Aktivität.....	48
4.5. Mechanismen der Entzündung nach ANV und Einsatz von Nebivolol oder Metoprolol .....	51
4.6. Genregulation von OAT1 und OAT3 nach ANV .....	53
4.7. Limitationen und Ausblick.....	55
5. Zusammenfassung .....	58
6. Anhang .....	59
6.1. Abbildungsverzeichnis.....	59
6.2. Tabellenverzeichnis.....	60
6.3. Literaturverzeichnis .....	60

Danksagung

Lebenslauf

Abkürzungen:

GFR	glomeruläre Filtrationsrate
RPF	renaler Plasmafluss
PAH	Paraaminohippursäure
AKI	acute kidney injury
ANV	akutes Nierenversagen
ATN	acute tubular necrosis
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
TGF	Tubulo-Glomeruläres-Feedback
NO	Stickstoffmonoxid
eNOS	endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase
iNOS	induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase
nNOS	neuronale Stickstoffmonoxid-Synthase
ROS	reactive oxygen species, reaktive Sauerstoffspezies
ATP	Adenosintriphosphat
cGMP	cyclisches Guanosinmonophosphat
MCP 1	monocyte chemoattractant protein 1
Il-1 $\beta$	Interleukin-1 $\beta$
NF- $\kappa$ B	nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
OAT	organic anion transporter

SGLT	sodium/glucose cotransporter
ISA	intrinsisch sympathomimetische Aktivität
mRNA	messenger Ribonukleinsäure, Boten-RNA
PCR	polymerase chain reaction, Polymerase-Kettenreaktion
qPCR	quantitative PCR, real-time PCR
RT-qPCR	Reverse Transkriptase real-time PCR
DNA	Desoxyribonukleinsäure
cDNA	copy-DNA, komplementäre DNA
ACE	Angiotensin-Conversions-Enzym
MW	Mittelwert
SE	Standard Error, Standardfehler
TNF- $\alpha$	Tumornekrosefaktor- $\alpha$

## 1. Einleitung

Ausgehend von der Klinik und Epidemiologie des akuten Nierenversagens soll hier über die Pathophysiologie auf die Mechanismen der Erkrankung eingegangen werden, die der Arbeit zugrunde liegen.

### 1.1. Das akute Nierenversagen

Die Entdeckung des akuten Nierenversagens als festes Krankheitsbild fand maßgeblich in Folge der deutschen Luftangriffe auf London während des 2. Weltkrieges statt, die gemeinhin als „The Blitz“ in die Geschichte eingingen. Zwar konnte Ludwig Frankenthal in Deutschland schon einige Jahre zuvor einen Zusammenhang zwischen einer Crush-Verletzung und dem daraufhin drohenden akuten Nierenversagen herstellen, doch die nun in London zahlreichen Verschüttungsoffer ließen den britischen Arzt Eric Bywaters die Kausalität vom massiv anfallenden Myoglobin hin zum akuten Nierenversagen, sowie zur Pigmentnephropathie erkennen. Er konnte zudem in Versuchen mit Kaninchen zeigen, dass ein auf diese Weise induziertes akutes Nierenversagen durch Harnalkalisierung und Volumengabe abgemildert werden kann.[1]

Damals beurteilte man die kurzfristig aufgetretene Beeinträchtigung der Nierenfunktion noch als eigenständige Krankheitsentität gegenüber der chronischen Nierenerkrankung, die schon seit dem Jahrhundert zuvor bekannt war. Heute geht man davon aus, dass beide Krankheitsbilder eng miteinander verknüpft sind und sich gegenseitig beeinflussen.[2]

#### 1.1.1. Definition, Ätiologie und Einteilung

Das akute Nierenversagen (ANV) ist eine plötzlich eintretende und potenziell reversible Abnahme der glomerulären Filtrationsrate (GFR).[3] Bei unterschiedlicher Ätiologie der Nierenschädigung kommt es zur Retention harnpflichtiger Substanzen (u.a. Azotämie) und zu Störungen des Flüssigkeits-,

des Elektrolyt- oder des Säure-Basen-Haushaltes. Klassischerweise ist beschrieben, dass das ANV zunächst durch eine an- bzw. oligurische, gefolgt von einer normo- bis polyurischen Phase gekennzeichnet ist. Dies ist allerdings nicht zwingend zu beobachten und überdies nicht Voraussetzung für die Definition der Krankheitsentität (s.u.).[4]

Die Ursachen für ein ANV können in prärenale, intrarenale oder postrenale unterschieden werden, wobei in bis zu 60% der Fälle ein prärenales ANV vorliegt.[4, 5] Die Nieren sind physiologischer Weise sehr gut durchblutet und erhalten bis zu einem Viertel des Herzzeitvolumens. Ist die Blutversorgung aufgrund einer systemischen oder lokal ausgeprägten Zirkulationsstörung eingeschränkt, kann sich ein prärenales ANV entwickeln. Die Gründe sind vielfältig und reichen von Hypovolämie oder einem zu niedrigen peripheren Gefäßwiderstand, etwa bei Sepsis, über eine eingeschränkte kardiale Auswurfleistung hin zu funktionellen oder strukturellen Durchblutungsstörungen der Nieren.[4] Die Niere ist hierbei im eigentlichen Sinne noch nicht selbst betroffen, kann aber bei anhaltender Minderversorgung[3] oder längerer Azotämie[4] einen ischämischen Schaden erleiden. Ein postrenales ANV kann sich bei Abflussstörungen der ableitenden Harnwege entwickeln, indem der erhöhte intratubuläre Druck der glomerulären Filtration entgegenwirkt und die Nierendurchblutung durch Obstruktion oder Inflammation gestört ist.[4] Die Therapie besteht hierbei grundsätzlich in einer Beseitigung des Abflusshindernisses. Eine intrarenale Ätiologie des ANV liegt vor bei Erkrankungen kleinen und größeren Gefäße der Niere, beispielsweise im Sinne einer Vaskulitis, Embolien, Glomerulonephritiden oder dem Hämolytisch-Urämischen Syndrom, bei interstitiellen Nephritiden oder nach ischämischen und toxischen Einflüssen.[4, 5] In Anlehnung an den pathologisch auffindbaren Zellschaden nach Ischämie oder Schädigung durch endo- oder exogene Nephrotoxine wird das ANV in diesen Fällen auch als „acute tubular necrosis“(ATN) bezeichnet.[4, 6]

Es wird ein akutes Nierenversagen, beziehungsweise „acute kidney injury“(AKI), diagnostiziert, wenn das Serumkreatinin entweder um mindestens 0,3mg/dl

innerhalb von 48 Stunden ansteigt, oder auf das 1,5-fache des Ausgangswertes innerhalb von 7 Tagen ansteigt oder die Urinausscheidung für mindestens 6 Stunden auf  $<0,5\text{ml/kgKG/h}$  abfällt.[7] Das ANV kann nach den AKIN Kriterien in Schweregrade eingeteilt werden:

<b>Grad</b>	<b>Serumkreatinin</b>	<b>Urinausscheidung</b>
<b>1</b>	Anstieg um $\geq 0,3\text{mg/dl}$ , oder Anstieg auf $\geq 150\%$ - $200\%$ des Ausgangswertes	$<0,5\text{ml/kgKG/h}$ über einen Zeitraum $>6$ Stunden
<b>2</b>	Anstieg auf $>200\%$ - $300\%$ des Ausgangswertes	$<0,5\text{ml/kgKG/h}$ über einen Zeitraum $>12$ Stunden
<b>3</b>	Anstieg auf $\geq 4,0\text{mg/dl}$ mit einem akuten Anstieg um $\geq 0,5\text{mg/dl}$ , oder Anstieg auf $>300\%$ des Ausgangswertes, oder Nierenersatztherapie	$<0,3\text{ml/kgKG/h}$ über einen Zeitraum $\geq 24$ Stunden, oder Anurie über einen Zeitraum $\geq 12$ Stunden

*Tabelle 1: AKIN Diagnose- und Klassifikationskriterien des ANV (nach [8])*

In der ebenfalls angewandten RIFLE-Klassifikation gibt es zudem noch Stadien, die einen kompletten Verlust der Nierenfunktion über  $>4$  Wochen („Loss“) oder über  $>3$  Monate („ESRD“: end stage renal disease) beschreiben.[9] Ansonsten ähneln sie den AKIN Kriterien.[10]

### 1.1.2. Epidemiologie

Das Auftreten des ANV ist bei Patienten in Krankenhäusern häufig und steigt weiter stark an.[11, 12] So sind 5% der Patienten während ihres Krankenhausaufenthaltes von einem ANV betroffen, auf Intensivstationen liegt die Inzidenz bei 50%.[3] Die Angaben zur Letalität bewegen sich zwischen 15% und 33%, je nachdem ob das ANV die Einweisungsdiagnose ist oder sekundär auftritt.[11] Bei Intensivpatienten wird die Letalitätsrate sogar mit 60% bis über 75% angegeben.[3, 13] Insgesamt erhöht die Diagnose eines ANV die Sterblichkeit auf das 5,5 bis 6,5-fache gegenüber Patienten mit vergleichbaren Erkrankungen ohne ANV.[4] Der Anteil der Fälle, in denen im Rahmen des ANV

eine Dialysebehandlung notwendig ist, wird zwischen 20%-75% angegeben und 10%-50% hiervon bedürfen auch weiterhin einer Dialyse.[4] Schließlich geht ein ANV auch mit einem längeren Krankenhausaufenthalt einher als der Ausfall einzelner anderer Organsysteme.[12]

Es sind verschiedene Risikofaktoren für das ANV bekannt. Dazu gehören unter anderem hohes Alter, männliches Geschlecht, Bluthochdruck, Diabetes mellitus, ein metabolisches Syndrom und die Zugehörigkeit zur schwarzen Ethnie.[2, 11] Eine vorbestehende, chronische Nierenerkrankung erhöht das Risiko eines ANV sogar um den Faktor 10 und ist somit der größte Risikofaktor.[2]

### 1.1.3. Klinischer Verlauf und Therapie

Die Symptome eines ANV sind unspezifisch. Oligo- oder Anurie sind ein entscheidender Hinweis, die Diagnose wird aber in der Regel bei gezielter Diagnostik im Zusammenhang mit entsprechenden Risiken gestellt.[10] Bei Patienten mit prädisponierenden Grunderkrankungen sollte daher frühzeitig die Nierenfunktion mittels Blut- und Urinuntersuchungen, sowie einer Flüssigkeitsbilanzierung kontrolliert werden.[3, 5] Es ist zudem zu beachten, dass bis zu 30% der ANV polyurisch verlaufen.[14]

Die Initialphase des ANV, die sich über Stunden bis Tage erstrecken kann, markiert den Beginn der Nierenschädigung und ist asymptomatisch. In der darauffolgenden stationären Phase manifestiert sich das ANV klinisch sowie laborchemisch und seine Folgeerscheinungen werden deutlich. Die fehlende Filtrationsleistung der Nieren führt zu Azotämie, Hyperkaliämie und weiteren Elektrolytstörungen, metabolischer Azidose, sowie zu Überwässerung des Organismus und Ödembildung. Der Patient kann dabei zunächst vermehrt Müdigkeit und Konzentrationsschwäche, gastrointestinale Probleme, Kopfschmerzen, Stenokardie und Störungen des peripheren oder zentralen Nervensystems wahrnehmen. Entscheidende Komplikationen sind dabei eine akute Linksherzinsuffizienz, Herzrhythmusstörungen, ein Lungen- oder Hirnödem, oder nosokomiale Infektionen. Anschließend tritt das ANV teils in eine

(mehrwöchige) polyurische Phase über, bei der auf Wasser und Elektrolytverluste zu achten ist. In der Erholungsphase des ANV kann sich die Nierenfunktion wieder komplett normalisieren. Selten kommt es direkt zu einem Übergang in ein chronisches Nierenversagen, auch wenn ein ANV ein Risiko für die Entstehung eines chronischen Nierenleidens darstellt.[2, 3, 5, 14, 15]

Zur Therapie des ANV sollte bei postrenaler Genese, welche in der Regel sonografisch diagnostiziert werden kann, die Obstruktion der ableitenden Harnwege beseitigt werden, oder alternativ eine transurethrale, bzw. suprapubische Harnableitung geschaffen werden. Im Falle eines intrarenalen ANV kann gegebenenfalls die zugrunde liegende Erkrankung behandelt werden.[15] Bei drohendem prärenalem ANV muss frühzeitig auf die hämodynamische Stabilisierung des Patienten geachtet werden, um eine ausreichende Perfusion der Nieren zu gewährleisten. Prophylaktisch kann zudem der Einsatz von Dopamin und Schleifen- oder Osmodiuretika sinnvoll sein. Mit Eintritt des ANV sollten diese Medikamente dann aber zunächst abgesetzt werden[3] und die Dosierungen der übrigen Medikamente gemäß ihrer renalen Exkretion angepasst werden.[5] Die Therapie konzentriert sich nun auf die Aufrechterhaltung des Blutdrucks, sowie die genaue Flüssigkeitsbilanzierung. Zusätzlich ist auf eine ausreichende Kalorienzufuhr von 35-50 kcal/kgKG/d und eine Insulintherapie bei Serumglukosewerten >180mg/dl zu achten.[3] Im Verlauf können schwere Störungen des Elektrolythaushalts, besonders des Kaliums(>6,5mmol/l), oder des pH-Wertes (<7,2 trotz normalem oder niedrigem CO<sub>2</sub>-Partialdruck im arteriellen Blut), symptomatische Urämie oder Volumenüberlastung und Lungenödem eine Dialyse erforderlich machen.[10, 14] Die medikamentösen Behandlungsmöglichkeiten beschränken sich im Wesentlichen auf den Einsatz von Schleifendiuretika zur Therapie einer ggf. bestehenden Volumenüberladung des Organismus, bzw. bei Volumenmangel auf die Zufuhr von kristalloiden Infusionslösungen.[5, 9] Im Schockgeschehen können dann darüber hinaus Vasopressoren zum Einsatz kommen.[9] Da es also keine spezifische Therapie des ANV gibt, scheint die weitere Erforschung der ihm unterliegenden Pathophysiologie von großer Bedeutung.[10, 16]

## 1.2. Pathophysiologie des akuten Nierenversagens

Das ANV ist ein vielseitiges Geschehen, das eine Fülle an pathophysiologischen Vorgängen beinhaltet, etwa Schädigungen der Blutgefäße, immunologisch-entzündliche Prozesse, eine Beeinflussung des Zellzyklus, sowie extra- und intrazelluläre Veränderungen des Nierenparenchyms.[2, 10] Dabei kommen neben adäquaten Reparaturmechanismen, die die Nierenfunktion wiederherzustellen vermögen, auch dauerhafte, strukturelle Umbauprozesse zum Tragen, aus denen sich eine chronische Niereninsuffizienz entwickeln kann.[2] Im Folgenden soll es vor allem um den Ablauf des ischämisch bedingten ANV gehen, welches den Versuchen dieser Arbeit zugrunde liegt.

Eine übermäßige und andauernde Vasokonstriktion der präglomerulären Nierengefäße gilt als charakteristisches Merkmal im ANV und trägt zur Ischämie und Hypoxie der Niere bei.[17-19] Vermittelt wird diese möglicherweise durch vermehrte Produktion von Angiotensin II, Thromboxan A<sub>2</sub> und Endothelin-1, die über G-Protein gekoppelte Rezeptoren einen erhöhten Gefäßtonus bewirken.[17] Diesem übergeordnet steht eine verstärkte sympathische Regulierung und somit eine Aktivitätssteigerung des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems (RAAS).[10, 18]

Unter physiologischen Bedingungen gibt es in der Niere verschiedene Systeme, die eine Vasodilatation der Nierengefäße bewirken. Im ANV reagieren diese teils paradox, teils greifen sie nicht mehr. So wurde etwa gezeigt, dass in ischämisch geschädigten Nieren Acetylcholin nicht mehr wie üblich eine Dilatation, sondern eine Vasokonstriktion bewirkt.[19, 20] Stickstoffmonoxid (NO) gilt als weiterer wichtiger Regulator des Gefäßtonus im Sinne eines dilatierenden Effektes, dessen Produktion aus der Aminosäure L-Arginin unter anderem über die endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase (eNOS) vermittelt wird.[21] Dieser die Hämodynamik am Vas afferens günstig beeinflussende Effekt der eNOS scheint im ANV verringert zu sein.[19, 22] Dem gegenüber steht die induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase (iNOS), die im ANV vermehrt exprimiert wird und

deren erhöhte relative Aktivität in Beziehung zur eNOS als Charakteristikum des ANV gilt.[20-23] Eine Verschiebung zugunsten der iNOS könnte zu einem funktionellen Mangel an NO führen, wofür die Tatsache spricht, dass man mit der Substitution des Substrates L-Arginin im ANV eine bessere Nierenleistung nach ischämischem ANV herbeiführen kann, obwohl dieses eigentlich in ausreichender Konzentration im Blut vorhanden ist. Dieser Sachverhalt wird auch als „L-Arginin Paradoxon“ bezeichnet.[21]

Ein weiterer Grund für die Reduktion der Nierendurchblutung und somit Abfall der GFR im ANV ist das an der Macula densa ausgelöste Tubulo-Glomeruläre-Feedback (TGF).[19, 24] Kommt es im Rahmen des ANV zu einer verringerten Rückresorption von Kochsalz im proximalen Tubulus, wird über diesen Mechanismus eine Konstriktion des Vas afferens im zugehörigen Nephron herbeigeführt.[25] Die Vasokonstriktion wird hierbei durch das im Bereich des juxtaglomerulären Apparates des distalen Tubulus vermehrt abgegebene Adenosin und seine Bindung an A<sub>1</sub>-Rezeptoren der Gefäßmyozyten vermittelt.[26]

Als besonders sensibel für den ischämischen Schaden, der mehr auf einer regionalen Verteilungsstörung als auf einer Reduktion der Gesamtdurchblutung der Nieren zu beruhen scheint, gilt die äußere Medulla, in der das S3-Segment des proximalen Tubulus und der dicke, aufsteigende Teil der Henle-Schleife liegen.[19]

Neben den oben genannten funktionell bedingten Veränderungen der Nierendurchblutung kommt es zusätzlich zu einer mechanischen Beeinträchtigung, die Folge eines Zellödems der Endothelien, der Aktivierung von Gerinnungskaskaden und der Interaktion von Leukozyten mit den Gefäßwänden ist. Hier zeigt sich, dass das ANV in gewisser Weise auch ein entzündlicher Prozess ist: Die Adhäsion der Leukozyten am Gefäßendothel wird von Zytokinen, Chemokinen, Eikosanoiden und reaktiven Sauerstoffspezies (reactive oxygen species, ROS) aktiviert, die teilweise in der Folge wiederum von den Leukozyten selbst gebildet werden und zum erhöhten Gefäßtonus beitragen.[19]

Des Weiteren ist der Aufbau des Zytoskeletts der Blutgefäße, sowie der Zell-Zell Kontakte und der Glykokalix der Endothelzellen gestört, was im ischämischen ANV die Gefäßpermeabilität erhöht und die Blutzirkulation beeinträchtigt.[19, 27]

In einer ersten Phase des ANV kommt es auf zellulärer Ebene zu einer Störung des physiologischen Natrium, Kalium und Kalziumhaushaltes und als Folge der Ischämie zu einer Erschöpfung der ATP-Reserven. Schon sehr früh kann es dann aufgrund des ATP-Mangels - und bei Reperfusion sogar noch beschleunigt durch den Wiederanstieg des pH-Wertes - zur Öffnung eines „Todeskanals“ in der Zellmembran und somit zur Nekrose der Zelle kommen.[19] Dieser Kanal setzt sich aus Proteinen der Membran selbst zusammen und macht sie für Makromoleküle durchlässig.[28]

Folgendes Schaubild veranschaulicht die oben beschriebenen Einflüsse auf die Niere im ischämischen ANV. Die verschiedenen pathophysiologischen Ereignisse bedingen sich zum Teil gegenseitig und potenzieren sich somit:

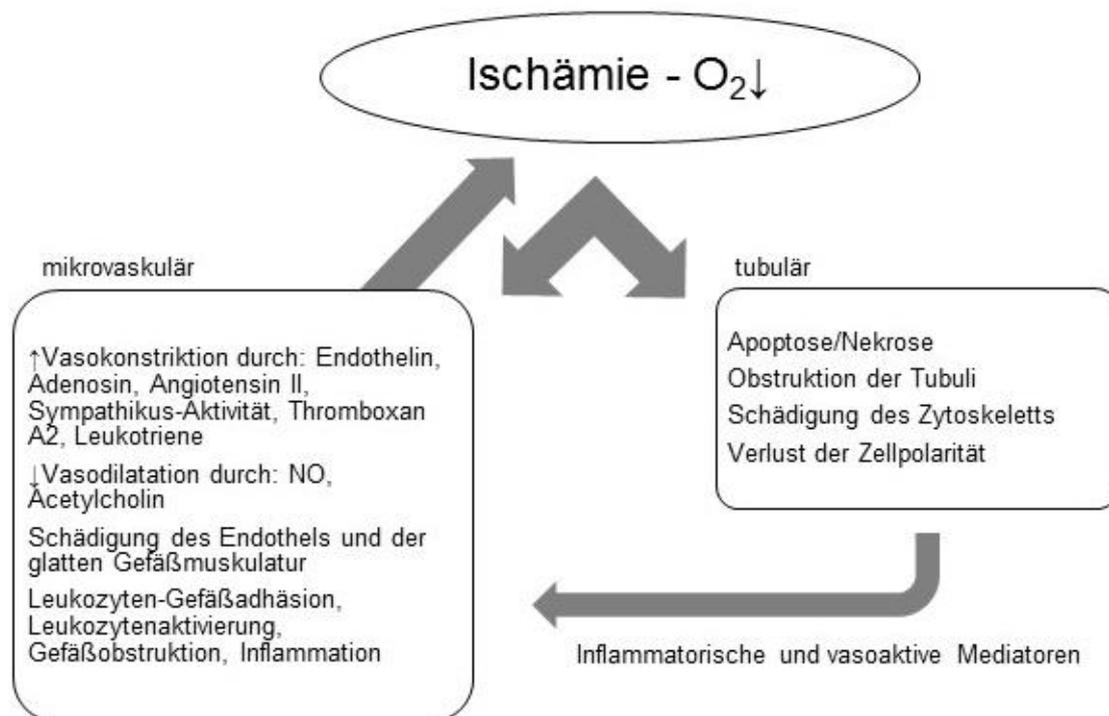


Abbildung 1: Pathophysiologie des ischämischen ANV (nach [19])

### 1.2.1. NO, iNOS und eNOS im ANV

Wie bereits oben beschrieben hat das Molekül NO eine wichtige Funktion für die Gefäßregulation, sowohl unter physiologischen Umständen als auch im ANV. NO wird von insgesamt drei Isoformen der NO-Synthase, eNOS, iNOS und nNOS (neuronaler NO-Synthase) aus der Aminosäure L-Arginin freigesetzt. In der glatten Gefäßmuskulatur bindet es an die Guanylylcyclase und bewirkt über einen intrazellulären Anstieg des Botenstoffes cGMP (cyclisches Guanosinmonophosphat) eine Vasodilatation. Auf Thrombozyten wirkt NO zudem aggregations- und adhäsionshemmend. Seine Wirkung im Körper wird durch Oxidation zu Nitrat und Nitrit binnen weniger Sekunden inaktiviert.[29]

Während der eNOS also neben dieser durchblutungssteigernden auch antiapoptotische und antioxidative Wirkungen nachgesagt werden, kann die iNOS-vermittelte NO-Freisetzung zu DNA-Schäden, Apoptose und indirekt zur Freisetzung von ROS, besonders Peroxynitrit, führen.[20, 29] In Versuchen konnte gezeigt werden, dass in proximalen Tubuluszellen tatsächlich die iNOS, nicht jedoch eNOS oder nNOS, für einen Schaden nach Hypoxie verantwortlich ist.[30] Eine selektive Inhibition der iNOS konnte im Experiment mit Ratten konsequenterweise den Nierenschaden verringern.[20] Über die iNOS synthetisiertes NO vermag weiter die eNOS-Aktivität zu reduzieren, was die Vasokonstriktion im ischämischen ANV weiter fördern könnte.[20] All diesem übergeordnet steht nach renaler Ischämie ein Ungleichgewicht der beiden NO-Synthasen zu Gunsten der iNOS.[23] Inwieweit dieses System zu beeinflussen ist, wurde bereits mit verschiedenen Substanzen – L-Arginin, dem NO-Donor Molsidomin, dem eNOS-Kofaktor Tetrahydrobiopterin oder dem NO-Blocker N<sup>ω</sup>-Nitro-L-Argininmethylester – untersucht.[31]

### 1.2.2. Das ANV als entzündlicher Prozess

Das Gesamtbild des ANV wird von inflammatorischen Prozessen mitbestimmt. Kurz nach der Reperfusion einer ischämisch geschädigten Niere kommt es über Selektine zur verstärkten Adhäsion und Aktivierung von Leukozyten (neutrophile

Granulozyten, Makrophagen, Lymphozyten) an den Gefäßendothelien, die dann beide, zusammen mit den Tubulusepithelien, Cytokine produzieren und somit die Aufrechterhaltung des ANV fördern.[4, 32, 33] Darüber hinaus könnten diese Entzündungsmediatoren durch ihre systemische Verbreitung im Blutkreislauf auch weitere Organe schädigen.[32, 34]

So ist das Protein MCP 1 (monocyte chemoattractant protein 1), das Teil der erworbenen Immunität ist und sowohl von Leukozyten als auch Tubuluszellen gebildet wird, im ANV von Interesse.[4, 32] In der Niere findet seine Bildung vermehrt nach einem ischämischen Ereignis statt.[32, 35] Wie der Name vermuten lässt, bewirkt es eine regionale Anreicherung und Aktivierung von Makrophagen, die ihrerseits die Immunantwort weiter vorantreiben.[36] Es konnte gezeigt werden, dass MCP 1 über seinen Rezeptor CCR2 in einem Ischämie-Reperfusion-Modell an Mäusen ursächlich für eine Tubulusnekrose, erhöhte Harnstoffwerte und die vermehrte Expression von iNOS ist.[35] Neben dem ischämischen ANV ist es auch an anderen Nierenerkrankungen beteiligt, etwa der diabetischen Nephropathie, der IgA-Nephritis oder einer interstitiellen Fibrose bei chronischer Abstoßungsreaktion gegen ein Nierentransplantat.[35]

Das zur angeborenen Immunität gehörende Cytokin Interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) ist nach Reperfusion erhöht und führt zur Einwanderung neutrophiler Granulozyten in das geschädigte Gewebe.[4, 32] IL-1 $\beta$  wird in Makrophagen produziert und nimmt Einfluss auf verschiedene entzündliche Erkrankungen der Niere. So aktiviert es intrazellulär den Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells), das über weitere Cytokine, unter anderem MCP 1, die Entzündungsreaktion amplifiziert. Ein weiterer Aktivierungsweg von NF- $\kappa$ B wird von Angiotensin II über den AT1-Rezeptor (siehe auch unten) vermittelt. Dabei haben Angiotensin II und IL-1 $\beta$  interessanterweise einen synergistischen Effekt.[37]

### 1.2.3. Störung der Transportprozesse im ANV

Die Funktionsstörung der (proximalen) Tubuluszellen im ANV wird von der eingeschränkten Aktivität diverser Transporter mitbestimmt, die in der Niere normalerweise an der physiologischen Resorption, beziehungsweise Sekretion von Elektrolyten, Nährstoffen, Medikamenten oder Giftstoffen beteiligt sind.[38, 39] Viele Transportprozesse werden etwa von einer verminderten Expression der  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase und somit Funktion nach renaler Ischämie negativ beeinflusst.[40]

Die Ausscheidung organischer Anionen, worunter auch das hier verwendete PAH fällt, kann zusätzlich zu ihrer Filtration im Glomerulus noch mittels aktiver Sekretion ins Tubuluslumen beschleunigt werden, womit die fraktionelle Ausscheidung einzelner Stoffe auf bis zu 500% gesteigert werden kann.[26] Dies geschieht in der Niere mit Hilfe der basolateral ausgebildeten Transporter OAT1 und OAT3 (organic anion transporter), die ihre Substrate tertiär-aktiv in der Tubuluszelle akkumulieren, wo sie dann entweder passiv entlang des chemischen oder elektrischen Gradienten, primär-aktiv, oder über nicht weiter bekannte Austauscher in das Tubuluslumen weitertransportiert werden.[25, 26, 41, 42] OAT1/3 vermitteln dabei den limitierenden Schritt dieses Transportsystems.[43] Nach ischämischem ANV kommt es zu einer Reduktion der GFR und des RPF.[43] Dieser kann, wie weiter unten beschrieben, mit der PAH-Clearance berechnet werden. Es konnte gezeigt werden, dass die Beeinträchtigung der PAH-Clearance nicht nur auf einer reduzierten Durchblutung und somit Filtration des Moleküls beruht, sondern auch auf eine verminderte Expression und somit Funktion der Transporter OAT1/3 zurückzuführen ist.[43] Eine pharmakologische Wiederherstellung der beiden Transporter nach ANV konnte im Experiment die Nierenleistung im Sinne erhöhter GFR und RPF verbessern.[44]

Die Transportprozesse, an denen OAT1 und OAT3 beteiligt sind, sind in folgender Abbildung dargestellt:

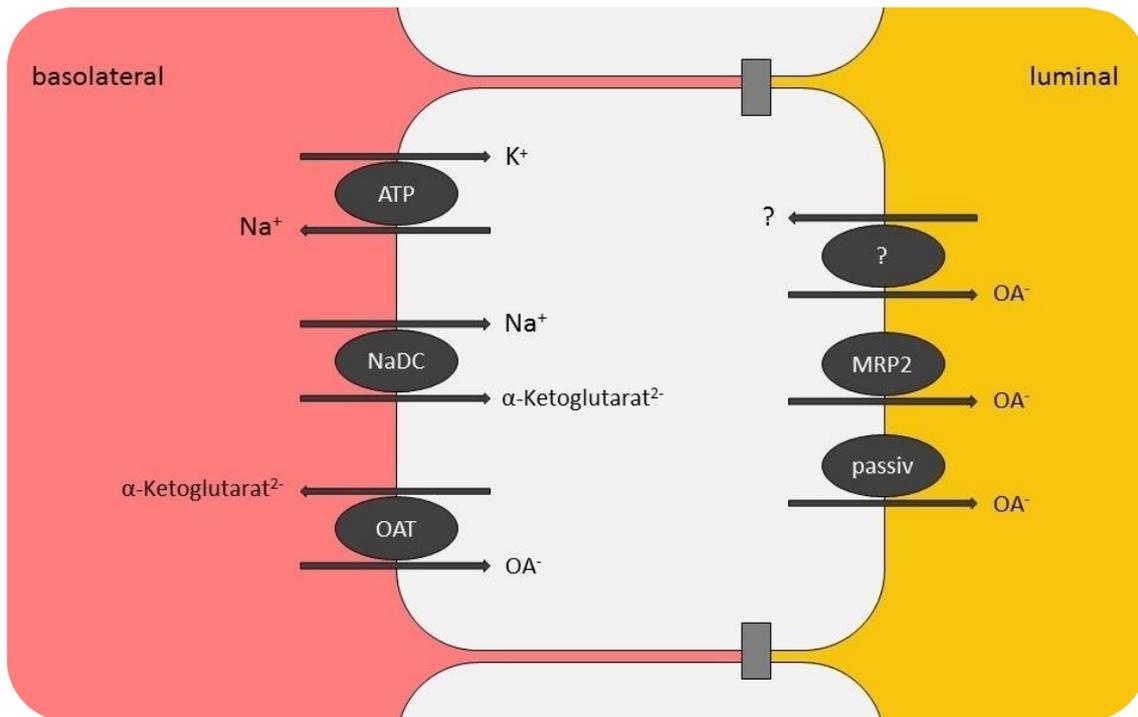


Abbildung 2: Sekretionsmechanismus organischer Anionen (OA<sup>-</sup>) an der proximalen Tubuluszelle (nach [26, 41]). ATP: Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase, NaDC: Na<sup>+</sup>-Dicarboxylat-Kotransporter, MRP2: Multidrug resistance-associated protein, OAT: OAT1/3; Erklärung: siehe Text

Für den Symport von Natrium zusammen mit Glukose existieren im menschlichen Körper die Transporter SGLT1 und SGLT2 (sodium/glucose-cotransporter), die an verschiedenen Epithelien exprimiert werden. Der weniger affine SGLT2 befindet sich luminal im frühproximalen Tubulus der Niere und transportiert jeweils ein Molekül Natrium zusammen mit einem Molekül Glukose, während der ebenso luminal im spätproximalen Tubulus gelegene SGLT1 eine höhere Affinität für seine Substrate besitzt und sie im Verhältnis 2:1 (Natrium:Glukose) aufnimmt.[25] Ihr sekundär-aktiver Transport wird von der Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase der Tubuluszellen aufrechterhalten.[45] Spätestens 24 Stunden nach einer renalen Ischämie kommt es zu einer vorübergehend verringerten Expression von SGLT1/2 und zu einer damit einhergehenden Glukosurie.[38, 40]

### 1.3. Die Renale Blutversorgung

Um die renale Durchblutung zu verstehen, ist es wichtig, die Anatomie der versorgenden Blutgefäße und deren Besonderheiten zu kennen. In der Niere gibt es 2 Kapillarsysteme, die hintereinander geschaltet sind und der Sauerstoffpartialdruck ist somit vergleichsweise gering. Er beträgt im Cortex etwa 70mmHg und fällt in der Medulla auf 20mmHg ab. Diese beiden Eigenschaften tragen dazu bei, dass es in der Niere schnell zur Hypoxie kommt.[27] Zusammen erhalten die beiden Nieren 20%-25% des Herzzeitvolumens.[15]

Die linke und rechte Nierenarterie, A. renalis sinister und dexter, entspringen direkt aus der Aorta abdominalis und verzweigen sich in den Nieren zunächst in die Aa. interlobares. Diese teilen sich wiederum in die Aa. arcuatae auf, die bogenförmig entlang der Mark-Rinden-Grenze verlaufen und die über die Aa. corticales radiatae in das Glomerulum-Konvolut (= 1. Kapillarsystem) mit je einem Vas afferens und einem Vas efferens münden. Die efferenten Arteriolen der juxtamedullären Glomerula gehen dann in die nach medullär absteigenden Vasa recta über, teilen sich dort auf (= 2. Kapillarsystem) und versorgen das Nierenmark mit seinem zugehörigen Tubulusapparat. Die Venen verlaufen analog zu den Arterien und sind entsprechend benannt.[27, 46] Folgende Abbildungen zeigen das Gefäßsystem der Niere in Beziehung zum Tubulusapparat und den Feinbau eines Glomerulums mit seinen angrenzenden Strukturen:

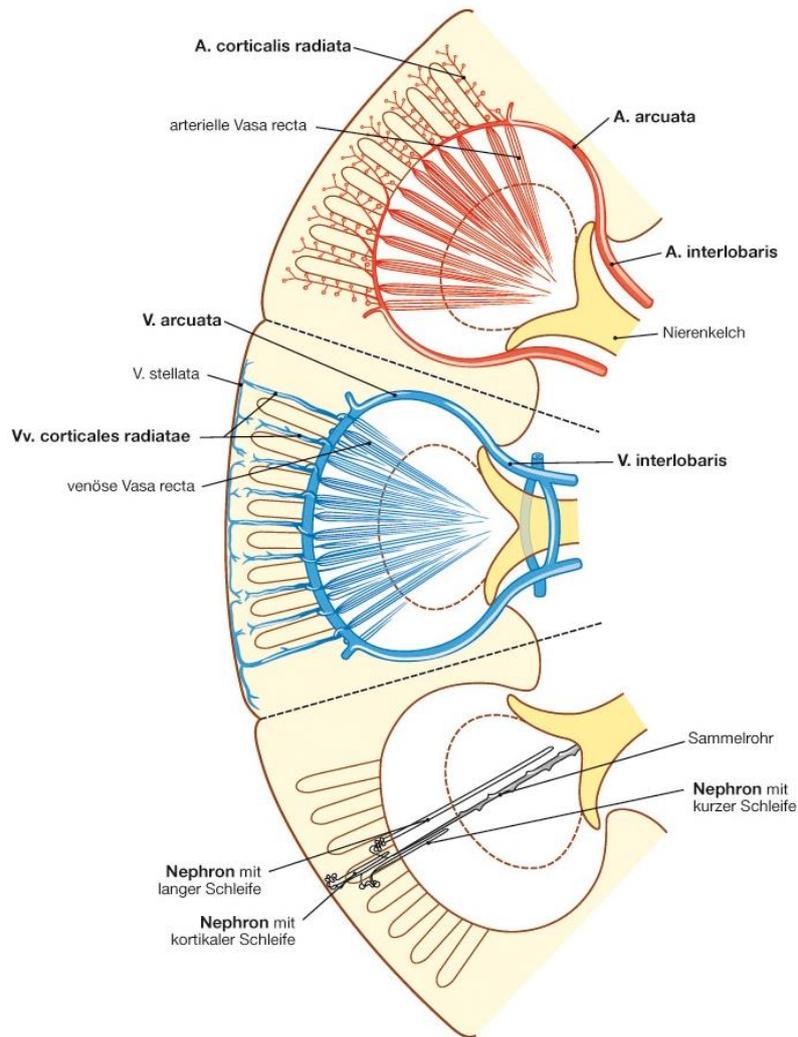


Abbildung 3: Gefäßsystem der Niere in Beziehung zum Tubulusapparat (aus [47]), mit freundlicher Genehmigung des Elsevier Verlags

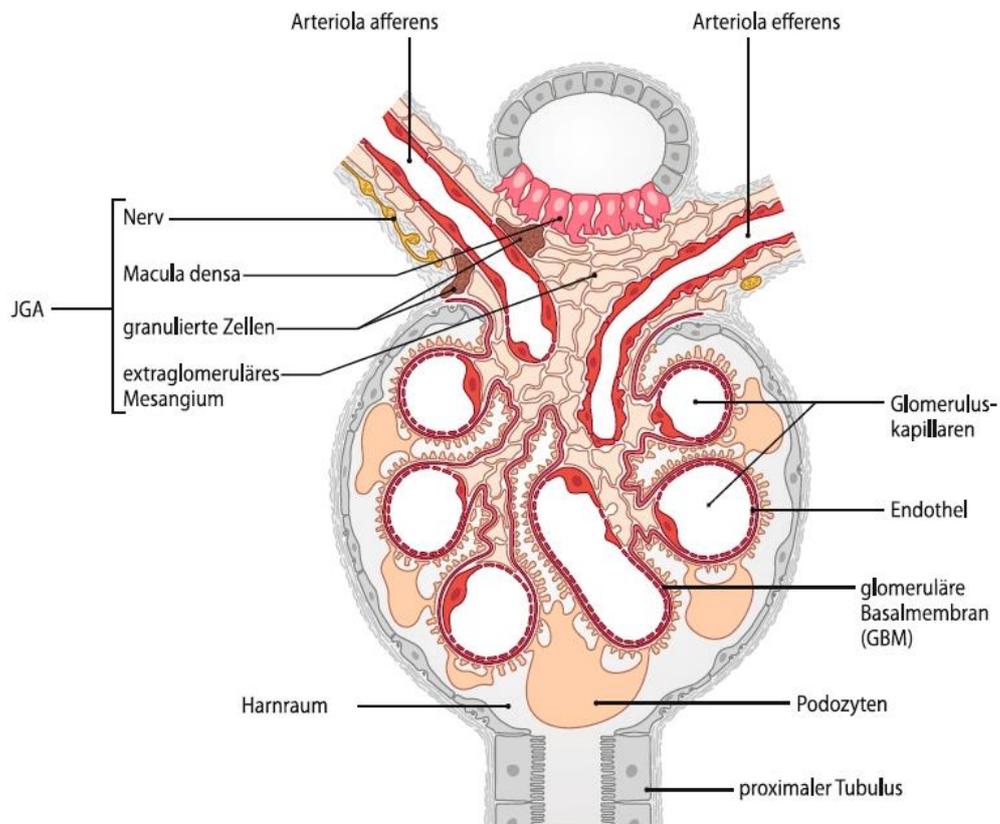


Abbildung 4: Anatomie des Glomerulums mit angrenzenden Strukturen (aus [48]), mit freundlicher Genehmigung von Springer Nature

Ein schon makroskopisch sichtbarer Unterschied der Rattenniere im Vergleich zur menschlichen Niere ist das Vorhandensein von lediglich einer Papille pro Niere. Der mikroskopische Aufbau, insbesondere des Blutgefäßsystems, ist hingegen weitestgehend identisch mit dem des Menschen.[49, 50]

Inwieweit  $\beta$ -Adrenorezeptoren die renale Perfusion und Filtration beeinflussen, ist weiter unten aufgeführt.

#### 1.4. Der Einfluss von Metoprolol und Nebivolol auf das ischämische ANV

Im Folgenden sollen kurz die wesentlichen Eigenschaften der beim verwendeten Betablocker und ihr Wirkansatz an der Niere beschrieben werden.

#### 1.4.1. Pharmakologie von Nebivolol

Nebivolol ist ein Betablocker der 3. Generation ohne intrinsische sympathomimetische Aktivität (ISA, siehe unten), der selektiv am  $\beta_1$ -Adrenorezeptor (circa 320-fach höhere Aktivität am  $\beta_1$ - gegenüber dem  $\beta_2$ -Rezeptor) wirkt und in der Behandlung des Bluthochdrucks und der Herzinsuffizienz eingesetzt wird. Zudem erhöht er die Bioverfügbarkeit von NO im Organismus, was zu seiner antihypertensiven, also blutdrucksenkenden Wirkung beiträgt.[51, 52] Der Mechanismus, über den Nebivolol NO freisetzt, beruht zumindest teilweise auf seiner  $\beta_3$ -agonistischen Aktivität, die die eNOS endothelialer Zellen aktiviert.[51-53] Auch die Stimulation von  $\beta_2$ -, Östrogen-, oder P2Y-Purinorezeptoren vermag eine NO-Freisetzung auszulösen.[54-56] Zudem wird vermutet, dass im Zuge seiner Wirkung über eine Reduktion reaktiver Sauerstoffspezies vermehrt NO zur Verfügung steht.[51]

Das im Organismus zu 98% an Eiweiß gebundene Nebivolol erreicht seine maximale Blutkonzentration nach 1,5-4 Stunden und wird in der Leber über direkte Glukuronidierung und das Cytochrom-P450-System (CYP2D6) verstoffwechselt. Seine Halbwertszeit beträgt dabei 12h und die Exkretion erfolgt zu etwa einem Drittel über den Urin, wobei 0,5% unverändert renal ausgeschieden werden.[29, 52] Die Bioverfügbarkeit bei oraler Applikation ist, bedingt durch einen starken First-Pass Effekt, 12%. Mit einem verzögerten Abbau bei eingeschränkter Nierenfunktion ist, wie auch bei Metoprolol, aufgrund der überwiegend hepatischen Metabolisierung nicht zu rechnen.[29]

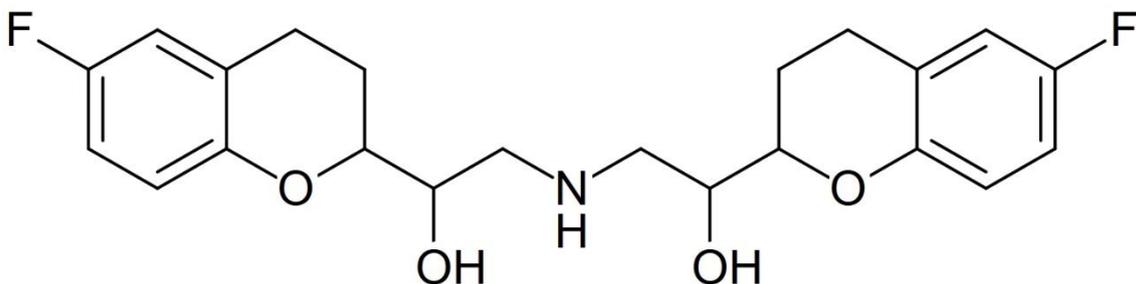


Abbildung 5: Strukturformel von Nebivolol (aus [57])

#### 1.4.2. Pharmakologie von Metoprolol

Metoprolol ist ein  $\beta_1$ -selektiv (circa 74-fach höhere Affinität für den  $\beta_1$ - als für den  $\beta_2$ -Rezeptor) wirkender Betablocker der 2. Generation, der in der Behandlung der koronaren Herzerkrankung, der Herzinsuffizienz und des Bluthochdrucks angewandt wird.[51, 52, 58] Ohne Einfluss auf  $\alpha$ -Rezeptoren, wirkt Metoprolol an  $\beta_1$ - und  $\beta_2$ -Rezeptoren als reiner Antagonist ohne partiellen Agonismus.[29] Man spricht dabei auch von einem Betablocker ohne intrinsisch sympathomimetische Aktivität.

Metoprolol hat bei oraler Applikation eine Bioverfügbarkeit von 40% und ist im Blut nur zu etwa 10% eiweißgebunden. Seine Halbwertszeit beträgt 4h und die Metabolisierung sowie Exkretion erfolgt ganz überwiegend hepatisch über das Cytochrom-P450-System (CYP2D6); lediglich 5% werden unverändert renal ausgeschieden. Somit ist auch bei eingeschränkter Nierenleistung nicht mit einer relevanten Veränderung der Pharmakokinetik zu rechnen ist. Metoprolol erreicht bei Einnahme als Tablette seine maximale Blutkonzentration nach 1-3h und die  $\beta$ -blockierende Wirkung hält zumindest über 24h an.[29, 59]

Strukturell besitzen  $\beta$ -Blocker eine starke Ähnlichkeit zu den Katecholaminen.[29]

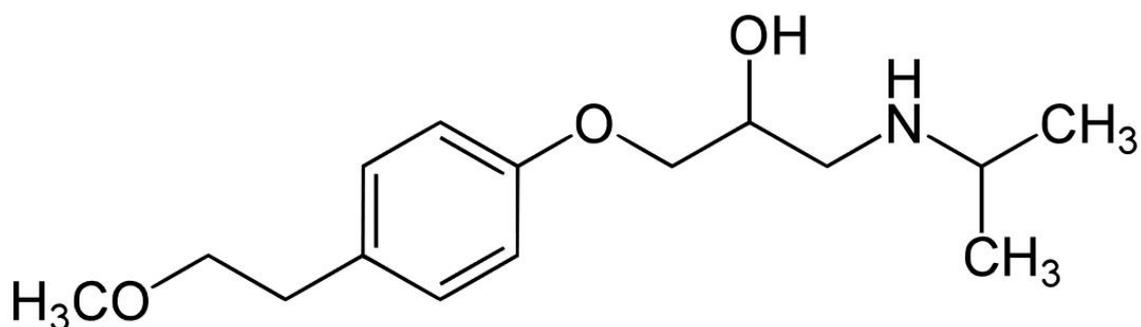


Abbildung 6: Strukturformel von Metoprolol (aus [60])

#### 1.4.3. Betarezeptoren, das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System und der Einfluss des Sympathikus auf die Niere

Die Niere als Organ unterliegt dem Einfluss des vegetativen Nervensystems und somit auch des Sympathikus, der mit seinen noradrenalinhaltigen

Nervenendigungen bis an den Tubulus- und juxtaglomerulären Apparat, den Ort der Synthese und Speicherung von Renin, heranreicht, in mannigfaltiger Weise. Die entsprechenden Nerven entspringen den Rückenmarksegmenten Th11-L3 und folgen nach ihrer rückenmarksnahen Umschaltung auf postganglionäre Fasern dem arteriellen System der Niere.[61]

So führt eine verstärkte sympathische Aktivität in den granulierten Zellen der afferenten Arteriole (Vas afferens) des Glomerulums zu einer Ausschüttung des Enzyms Renin. Dieser Vorgang wird über  $\beta$ 1-Rezeptoren vermittelt und der antihypertensive Effekt der Betablocker beruht im Wesentlichen auf diesem Mechanismus. [29, 62, 63] Nach seiner Freisetzung fungiert Renin als Protease und spaltet von dem hepatisch synthetisierten Angiotensinogen das Peptid Angiotensin I ab. Von diesem wiederum spaltet das Angiotensin-Conversions-Enzym (ACE), das in Endothelzellen und im Blut vorkommt, Angiotensin II ab. Dieses besteht nur mehr aus 8 Aminosäuren. Schließlich erhöht Angiotensin II (und das ebenso entstandene Angiotensin III) die Sekretion von Aldosteron aus der Nebenniere. Die Kette dieser Ereignisse und die davon hervorgerufenen Effekte werden als Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS) bezeichnet.[25, 29] Angiotensin II vermittelt seine Effekte, die an verschiedenen Organen und Wirkorten im Körper angreifen, vor allem über den AT1-Rezeptor, der, wie auch die Adrenorezeptoren, zur Familie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren gehört. Eine Steigerung der Kontraktilität der glatten Gefäßmuskulatur führt zu einer Erhöhung des peripheren Widerstandes und somit des systemischen Blutdrucks. In der Niere verringert sich die Durchblutung und es kommt zur Konstriktion renaler Arteriolen, womit die GFR herabgesetzt wird. Das Vas efferens wird stärker als das Vas afferens kontrahiert, um zunächst über erhöhten Filtrationsdruck einen zu starken Abfall der GFR bei reduzierter Nierendurchblutung zu gewährleisten.[29, 45, 64]

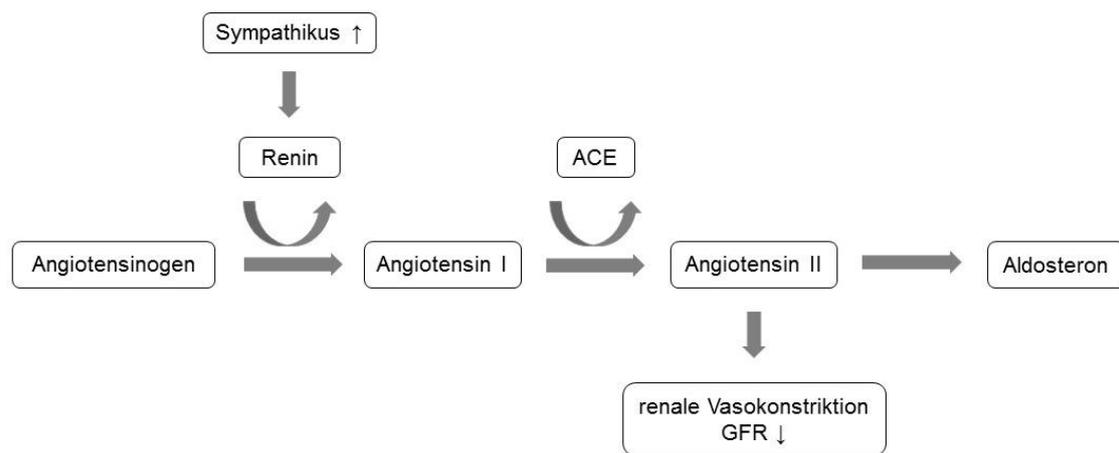


Abbildung 7: Das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System

$\beta_1$ -Adrenorezeptoren sind nicht nur an den Granulazellen des juxtaglomerulären Apparates nachweisbar, sondern auch an den Zellen der Macula densa und an den ihr vorgeschalteten Tubuluszellen. Eine konzentrationsabhängige NaCl-Aufnahme an der Macula densa über  $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ -Kotransporter vermittelt eine Reninsekretion, die bei verringertem intraluminalen NaCl auftritt.[65, 66] Agonisten an  $\beta_1$ -Adrenorezeptoren könnten hier über eine Steigerung der NaCl-Aufnahme vor der Macula densa indirekt zu einer vermehrten Reninsekretion führen.[66]

Auch an den Mesangiumzellen des Glomerulums finden sich  $\beta_1$ -Adrenorezeptoren, die möglicherweise eine Kontraktion derselben auslösen und somit Einfluss auf die Durchblutung des entsprechenden Abschnittes nehmen.[63, 66] Weitere  $\beta_1$ -Rezeptoren konnten an größeren intraparenchymalen Arterien (Aa. arcuatae) und an afferenten Arteriolen nachgewiesen werden, die somit einen Einfluss auf die Gesamtdurchblutung der Niere haben könnten.[66]

Es gibt auch sympathische Einflüsse auf die Niere, die an  $\alpha$ -Rezeptoren gekoppelt sind. Eine Erhöhung der Flüssigkeitsreabsorption wird beispielsweise über  $\alpha$ -Adrenorezeptoren vermittelt.[61] Bei Stimulation der  $\alpha_{1A}$ -Adrenorezeptoren an den renalen Widerstandsgefäßen nimmt beispielsweise die

Nierendurchblutung (RPF) ab.[62] Dies bleibt allerdings in dem hier dargestellten Experiment außen vor, da die beiden Pharmaka Nebivolol und Metoprolol eben keine Wirkung auf  $\alpha$ -Adrenorezeptoren haben. Zudem kommt es erst bei stärkerem Sympathikotonus zu derartigen Effekten, wohingegen die Reninfreisetzung via  $\beta$ 1-Adrenorezeptoren schon sehr schnell zum Tragen kommt.[61]

Alles in allen führt die sympathische Aktivität in der Niere also zu Vasokonstriktion und einer Verringerung der GFR und des RPF.[62, 67, 68]

### 1.5. Arbeitshypothese

Ein übermäßig starker Sympathikotonus und der Einfluss von Angiotensin II sind in der Akutphase des Nierenversagens zwei wichtige und charakteristische Merkmale, die zur Schädigung der Organfunktion aufgrund gesteigerter renaler Vasokonstriktion beitragen.[4, 10, 18, 19, 22]  $\beta$ 1-Adrenorezeptoren sind in verschiedenen Bereichen der Niere exprimiert und nehmen Einfluss auf die renale Durchblutung, was teils indirekt über das RAAS geschieht.[63, 66] Eine Hemmung der renalen sympathischen Aktivität mit den  $\beta$ 1-spezifischen Betablockern Nebivolol oder Metoprolol sollte daher einen positiven Einfluss auf die Nierenfunktion im ischämischen akuten Nierenversagen haben. Wichtig ist hierbei, dass die beiden Präparate keine ISA besitzen, um nicht als Partialagonisten an anderer Stelle einen gesteigerten Sympathikotonus zu vermitteln.

Ein funktioneller NO-Mangel und ein Aktivitätsungleichgewicht zwischen eNOS und iNOS sind weitere pathophysiologisch bedeutende Aspekte des ANV. [19, 20, 22, 31] Die Verabreichung L-Arginins oder des NO-Donors Molsidomin wirken sich beispielsweise protektiv auf das ANV aus.[21, 69] Da auch Nebivolol NO freisetzt, könnte es sich noch deutlicher positiv als Metoprolol (additiv, beziehungsweise überadditiv/potenzierend) auf die Nierenleistung auswirken.

Ziel der Arbeit ist es also, den Effekt von Nebivolol und Metoprolol auf die funktionellen Parameter GFR und RPF, sowie auf weitere Veränderungen genetischer Regulierung des NO-Stoffwechsels, der Inflammation und der renalen Transporterfunktion zu untersuchen.

## 2. Material und Methoden

Die zur Untersuchung der Arbeitshypothese angewandten Verfahren sind im folgenden Teil beschrieben.

### 2.1. Versuchstiere

Für die Versuche wurden weibliche Sprague Dawley<sup>®</sup> Ratten der Firma Charles River (Charles River Laboratories Germany GmbH, Sulzfeld) verwendet. Das Gewicht der Ratten lag zwischen 182 und 252 Gramm (Mittelwert 211 Gramm, Standardabweichung 18 Gramm). Die Tiere hatten nach ihrem Transport bis zum ersten Eingriff noch eine Ruhezeit von mindestens 24 Stunden. Dabei wurde ein Hell-Dunkel-Zyklus von jeweils 12 Stunden eingehalten. Futter und Wasser waren ihnen ad libitum zugänglich. Vor dem ersten Eingriff waren die Ratten in Käfigen mit insgesamt zwei bis sechs anderen Tieren arrangiert. Nach der Induktions- beziehungsweise Sham-Operation waren die Tiere stets in Einzelkäfigen bei ansonsten gleichen Bedingungen untergebracht.

### 2.2. Induktion des ischämischen akuten Nierenversagens

Die Ratten wurden zunächst mit 75mg/kgKG Ketaminhydrochlorid (Ketamin 10%, medistar<sup>®</sup> Arzneimittelvertrieb GmbH) und 5mg/kgKG Xylazinhydrochlorid (Xylazin 2%, CEVA Tiergesundheit GmbH, Düsseldorf) narkotisiert. Die Applikation erfolgte intraperitoneal in den linken unteren Quadranten des Abdomens mittels einer Insulinspritze (Omnican<sup>®</sup> 40, B-Braun Melsungen AG, Melsungen). Bestand während des Eingriffes noch weiterer Bedarf, so wurden diese beiden Präparate in gleichem Verhältnis, aber kleinerer Dosierung nachgespritzt.

Die Tiere wurden an ihren Flanken rasiert und gewogen (elektronische Waage, MP-3000, Chyo Balance Corp., Japan). Für den Eingriff wurden sie dann auf eine Heizplatte (Typ 12511, Medax, Nagel GmbH, Kiel), die bereits auf 37°C

vorgeheizt war, in Rechtsseitenlage gelegt, wobei die Vorder- und Hinterbeine mit Pflasterstreifen (Durapore™, 3M Health Care, St. Paul, MN USA) befestigt wurden. Die Augenpartien wurden mit 5% Dexpanthenolsalbe (Bepanthen®, Bayer Vital GmbH, Leverkusen) vor Austrocknung geschützt.

Nach gründlicher Reinigung und Desinfektion (Braunol® Povidon-Iod, B-Braun Melsungen AG, Melsungen) der Regio lumbalis wurden im 45° Winkel zur Wirbelsäule und zur Incisura thoracis inferior zunächst die Haut und dann die Muskulatur eröffnet. Zum Offenhalten des circa 2cm langen Schnittes wurde ein Retraktor eingesetzt. Die linke Niere wurde unter Schonung größerer Gefäße stumpf aus ihrer Fettkapsel freipräpariert und die A. und V. renalis, sowie der Ureter, durch leichtes Verschieben der Niere nach ventral dargestellt. Ohne die anderen Gefäße zu verletzen, wurde nun die A. renalis mit einer spitzen, gebogenen Pinzette unterwandert und ein Polyesterfaden (5-0 Ethicon Ethibond Excel, Johnson & Johnson GmbH, Neuss) unter ihr hindurchgezogen, ohne dabei die Blutzufuhr zu unterbrechen. Anschließend wurde das OP-Gebiet mit einem Hautpflaster (Fixomull® transparent, BSN medical GmbH, Hamburg) provisorisch verschlossen. Die Ratte wurde auf der Heizplatte gewendet, somit in Linksseitenlage gebracht und gleichermaßen wie oben beschrieben desinfiziert. Haut und Muskeln wurden durchtrennt, die rechte Niere freigelegt und ein Faden um die A. renalis platziert. Durch leichten Zug am Polyesterfaden wurden die Aa. renales leicht aufgefunden und mit einem Gefäßmikroclip („Biemer“ 9mm, Medicon eG, Tuttlingen) abgeklemmt. Der Schnitt wurde wieder mit einem Hautpflaster bedeckt und auf der Gegenseite ein gleicher Gefäßclip angebracht. Der Beginn der 45-minütigen Ischämiezeit war sofort durch Erblassen der Nieren sichtbar. Nach Ende der Ischämiezeit wurden die beiden Clips und die an den Aa. renales angebrachten Fäden entfernt. Die Reperfusion der beiden Nieren war makroskopisch sichtbar, da sie schnell wieder ihre anfängliche Farbe zurückerhielten. Die Muskulatur wurde mit einer fortlaufenden Naht und die Hautschnitte mit einer Einzelknopfnahnt verschlossen. Dabei wurde ein Polyesterfaden (4-0 Polyesterfaden grün, Resorba®, Nürnberg) verwendet. Die Pflasterstreifen, die noch um die Beine gewickelt waren, wurden entfernt. Zum Ausgleich des intraoperativen Flüssigkeitsverlustes wurde den Ratten 0,5ml

0,9% Kochsalzlösung subkutan in die Nackenfalte gespritzt. Die postoperative Analgesie erfolgte mit 2mg/kgKG Tramalhydrochlorid (Tramal<sup>®</sup>, Grünenthal GmbH, Aachen). Bis zum Rücktransport in den Tierstall wurden die Ratten in ihrem Einzelkäfig noch an einem Heizstrahler warm gehalten.

Für die Versuchsdurchführung wurden sterile Operationsinstrumente verwendet; diese wurden im Anschluss an jeden Eingriff in geeigneter Lösung (Sekusept<sup>®</sup> PLUS, Ecolab GmbH, Wien) desinfiziert.

### 2.3. Folgeeingriff und Entnahme von Organen, Blut und Urin

Nach 24 Stunden wurden die Ratten wie unter 2.2. beschrieben narkotisiert, die Augen mit Dexpanthenolsalbe versorgt und in Rückenlage auf die 37°C warme Heizplatte gelegt. Die Regio cervicalis wurde mit einem Hautantiseptikum (Cutasept<sup>®</sup>F, Haut-Desinfiziens, Bode Chemie GmbH, Hamburg) gründlich desinfiziert. Nun wurde mit einer Schere die Haut über der rechten Halsregion entfernt und die V. jugularis freipräpariert. Dabei wurden einzelne kleine Blutungen aus oberflächlichen Gefäßen gegebenenfalls mit dem Elektrokauter gestillt. Die V. jugularis wurde unterwandert und 2 Fäden (5-0 Ethicon Ethibond Excel, Johnson & Johnson GmbH, Neuss) wurden unter ihr im Abstand von etwa 1-2cm hindurchgezogen. Der distale Faden wurde zugeknotet, womit die V. jugularis abgebunden war. Zwischen den Fäden wurde dann die Gefäßwand mit einem kleinen Schnitt eröffnet und ein spitz zulaufender Polyethylenkatheter (ID: 0,75mm, OD: 1,22mm, Portex, England) in die Vene in Richtung des Herzens vorgeschoben. Mit dem proximalen Faden konnte anschließend der Venenkatheter fixiert werden. Eine mit 0,9% Kochsalzlösung angefeuchtete Mullkomresse über der offenen Stelle schützte vor übermäßigem Flüssigkeits- und Wärmeverlust. Durch den Katheter wurde dann kontinuierlich mit einer Laufrate von 0.07ml/min eine Lösung aus 2mg/ml PAH (Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim) und 2mg/ml FITC-Inulin (Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim) in 0,9% NaCl appliziert. Um FITC-Inulin in Lösung zu bekommen, war es über eine halbe Stunde bei 40°C in der vorgefertigten PAH Lösung erwärmt

worden. Hierfür diente ein Heizblock (Typ 5100 6101, Gebr. Liebisch, Bielefeld). Die Infusion wurde mit einem Perfusor (Perfusor® F, B-Braun Melsungen AG, Melsungen) gesteuert.

Danach wurde die Haut des Hypogastriums mit dem Hautantiseptikum desinfiziert und eine kleine Stelle offengelegt. Die Blase wurde unter Erhalt der Ureteren freigelegt und ein Faden (5-0 Ethicon Ethibond Excel, Johnson & Johnson GmbH, Neuss) um sie gelegt. Mit einer Schere wurde ein kleines Loch in das Blasendach geschnitten, durch das ein Polyethylenkatheter (ID: 0,75mm, OD: 1,22mm, Portex, England) eingeführt werden konnte. Dieser wurde mit dem Faden festgebunden und der Urin konnte über ihn ablaufen. 30 Minuten nach Beginn der Infusion wurde der Urin über die folgenden 20 Minuten hinweg in einem Reagenzglas aufgefangen. Nach exakt 20 Minuten wurde das Gefäß entfernt und das Abdomen der Ratte durch eine mediane Laparotomie komplett eröffnet. Die Darmschlingen wurden zur Seite geschoben und die Aorta abdominalis freigelegt. Im Abstand von 2cm wurde die Aorta mit 2 Gefäßmikroclips („Biemer“ 9mm, Medicon eG, Tuttlingen) abgeklemmt und dazwischen mit einer Schere eröffnet. Hier konnte eine Butterflynadel (Venofix® S 19G, B-Braun Melsungen AG, Melsungen) eingeführt werden. Durch Entfernen des proximalen Clips nach Euthanasie des Tieres strömte das Blut in einer definierten Menge über die Nadel in ein Reagenzglas. Um die Blutgerinnung zu verhindern, war der Butterfly zuvor mit Heparin (Heparin-Natrium-25000-ratiopharm®, ratiopharm GmbH, Ulm) durchgespült worden. Zeitgleich mit der Blutentnahme wurde die Infusion gestoppt. Der Urin und die Blutprobe wurden vorübergehend auf Eis gekühlt, dann 10 min. bei 4°C und 3000rpm zentrifugiert (Rotina 46R, Andreas Hettich GmbH und Co. KG, Tuttlingen), das Blutplasma abpipettiert und anschließend bei -20°C gelagert. Zuletzt wurden noch die Nieren am Hilusbereich abgetrennt und in eisgekühltem Krebspuffer (1,55M NaCl; 0,15M KCl; 0,11M CaCl<sub>2</sub>; 0,155M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 0,155M MgSO<sub>4</sub>; 0,8M NaHCO<sub>3</sub>; Ampuwa®[Fresenius Kabi AG; Bad Homburg v. d. Höhe] ad 1000ml; 2,0g D(+)-Glukose-Monohydrat; 10mg EDTA; 30min. begast mit 95% O<sub>2</sub>/5% CO<sub>2</sub>) gewaschen. Cortex, Medulla und Papille wurden makroskopisch getrennt, in Flüssigstickstoff gefroren und bei -80°C aufbewahrt. Ein Querschnitt auf Höhe

der Papille einer der beiden Nieren wurde vorübergehend auf Trockeneis gelagert und dann ebenfalls bei -80°C gelagert.

#### 2.4. Einteilung der Versuchstiere in Gruppen

Die Versuchstiere wurden randomisiert in verschiedene Gruppen eingeteilt:

*Kontrolle:* Bei diesen Tieren wurde lediglich der Folgeeingriff, wie unter 2.3. beschrieben, durchgeführt.

*Sham(+NaCl):* Bei diesen Tieren wurden beide Eingriffe, wie unter 2.2. und 2.3. beschrieben, durchgeführt. Jedoch wurden bei der Induktionsoperation keine Fäden um die Aa. renales gelegt und keine Gefäßclips angebracht. Zudem wurde ihnen am Ende der Induktionsoperation 0.5ml 0,9% Kochsalzlösung intraperitoneal appliziert, bevor die Wunden komplett verschlossen wurden.

*Sham+Nebivolol:* Bei diesen Tieren wurden beide Eingriffe, wie unter 2.2. und 2.3. beschrieben, durchgeführt. Jedoch wurden im Laufe der Induktionsoperation keine Fäden um die Aa. renales gelegt und keine Gefäßclips angebracht. Zudem wurde ihnen am Ende der Induktionsoperation, sobald der Schluckreflex wieder gut ausgeprägt war, 5mg Nebivolol (Nebilet® 5mg Tabletten, Berlin-Chemie AG, Berlin) per Schlundsonde in den Magen appliziert. Die Nebivololtablette war zuvor in circa 2ml 0,9% Kochsalzlösung aufgelöst worden.

*Sham+Metoprolol:* Bei diesen Tieren wurden beide Eingriffe, wie unter 2.2. und 2.3. beschrieben, durchgeführt. Jedoch wurden im Laufe der Induktionsoperation keine Fäden um die Aa. renales gelegt und keine Gefäßclips angebracht. Zudem wurde ihnen am Ende der Induktionsoperation, sobald der Schluckreflex wieder gut ausgeprägt war, 50mg Metoprolol-tartrat (Metobeta® 50, betapharm Arzneimittel GmbH, Augsburg) per Schlundsonde in den Magen appliziert. Die Metoprololtablette war zuvor in circa 2ml 0,9% Kochsalzlösung aufgelöst worden.

*Clamp(+NaCl):* Bei diesen Tieren wurden beide Eingriffe, wie unter 2.2. und 2.3. beschrieben, durchgeführt. Zudem erhielten sie am Ende der Induktionsoperation

0.5ml 0,9% Kochsalzlösung intraperitoneal appliziert, bevor die Wunden komplett verschlossen wurden.

*Clamp+Nebivolol:* Die Tiere dieser Gruppe wurden in Analogie zu 2.2 und 2.3 operiert. Bei Wiedererlangen des Schluckreflexes erhielten sie zusätzlich einmalig 5mg Nebivolol (Nebilet® 5mg Tabletten, Berlin-Chemie AG, Berlin), aufgelöst in 2ml 0,9% Kochsalzlösung, per Schlundsonde in den Magen verabreicht.

*Clamp+Metoprolol:* Die Tiere dieser Gruppe wurden entsprechend 2.2 und 2.3 operiert. Bei Wiedererlangen des Schluckreflexes erhielten sie zusätzlich einmalig 50mg Metoprolol-tartrat (Metobeta® 50, betapharm Arzneimittel GmbH, Augsburg), aufgelöst in 2ml 0,9% Kochsalzlösung, per Schlundsonde in den Magen verabreicht.

Die Gruppen Clamp(+NaCl), Clamp+Nebivolol und Clamp+Metoprolol wurden bereits zuvor von einem anderen Operateur unserer Arbeitsgruppe operiert und standen zum Vergleich mit den restlichen, von mir operierten Tieren, bereit. Die Ergebnisse und Veränderungen der Clamp-Gruppe waren dabei im Einklang mit von mir operierten Clamp-Tieren (nicht Teil dieser Arbeit). Um die Ergebnisse der Clearance-Messungen, sowie der PCR nebeneinander darzustellen, wurden jeweils die Mittelwerte der Sham(+NaCl) Gruppen beider Operateure gleichgesetzt und der somit erhaltene Umrechnungsfaktor auf die beiden Interventionsgruppen angewandt.

## 2.5. Bestimmung der Inulin-Clearance

Zur Bestimmung der GFR wurde Fluoreszein-Isothiocyanat-Inulin, FITC-Inulin, (Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim) verwendet, das zu diesem Zweck an Ratten gut erprobt ist.[70] Inulin ist ein Polysaccharid aus der Gruppe der Fruktane, es hat eine Molekülmaße von circa 5kDa und ist inert, d.h. es wird in den Nieren frei filtriert und im Tubulus weder resorbiert noch sezerniert, neu gebildet oder abgebaut.[25]

Die Inulin-Clearance kann mit der GFR gleichgesetzt werden und trägt die Einheit [ml/min], d.h. sie stellt ein gedachtes Plasmavolumen dar, das in einer bestimmten Zeit komplett von Inulin – in diesem Fall durch Filtration in den Glomeruli und Ausscheidung mit dem Harn - bereinigt wird. Die GFR wurde unter Anwendung folgender Formel berechnet:

$$GFR = \frac{V(U) \times U(in)}{P(in)} \text{ [ml/min]}$$

---

*V(U) = Urinzeitvolumen [ml/min]; U(in) = Inulinkonzentration im Sammelurin [g/l]; P(in) = Inulinkonzentration im Plasma [g/l]*

Das Urinvolumen wurde ermittelt, indem der Urin auf einer Laborwaage (Kern PLS 310-3F, Kern & Sohn GmbH, Balingen) gewogen wurde. Die Urindichte wurde dabei annäherungsweise mit der Dichte von Wasser gleichgesetzt. Die Urinsammelzeit betrug stets 20 Minuten. Die Inulinkonzentrationen im Urin und im Plasma wurden photometrisch bestimmt. Die Proben wurden hierfür zunächst nach sorgfältigem Durchmischen bei Raumtemperatur im Verhältnis 1:500 mit einem MES-TES Puffer verdünnt. Dieser Puffer wurde aus 1,15g TES (N-tris[Hydroxymethyl]methyl-2-aminoethanesulfonic acid) und 1,00g MES (2-[N-Norpholino]ethanesulfonic acid) in 1l Aqua dest. hergestellt und mit 1N NaOH auf einen pH-Wert von 7,4 abgepuffert. Anschließend wurde die Fluoreszenz der Proben auf einer 96-well Mikrotiterplatte (BRANDplates®, pureGrade™, Brand GmbH + CO KG, Wertheim) mit einem Photometer (1420 Victor<sup>2</sup> multilabel counter, Wallace, USA) bei einer Wellenlänge von 480nm gemessen. Die Intensität der Emission mit einer Wellenlänge von 520nm war dabei direkt proportional zur FITC-Inulin Konzentration der Proben. Die Umrechnung der Werte für Urin und Plasma erfolgte an einer jeweiligen Standardkurve aus bekannten Mengen FITC-Inulin und MES-TES Puffer.

## 2.6. Bestimmung der PAH-Clearance

Zur Bestimmung des renalen Plasmaflusses wurde Paraaminohippursäure (Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim) verwendet. PAH ist ein Derivat der Aminosäure Glycin und der Paraaminobenzoessäure mit einer renalen fraktionellen Ausscheidung von etwa 500%. Zusätzlich zur filtrierten Menge wird pro Zeiteinheit also noch das Vierfache durch Sekretion aus den Tubuli in den Harn abgegeben, so dass in der Nierenvene kaum noch PAH nachweisbar ist. Diese Eigenschaft erlaubt es, die PAH Clearance annähernd mit dem RPF gleichzusetzen.[25] Die PAH-Clearance stellt dabei wieder ein gedachtes Plasmavolumen dar, das in einer bestimmten Zeit komplett von PAH gereinigt wird. Zur Berechnung des RPF wurde folgende Formel verwendet:

$$RPF = \frac{V(U) \times U(PAH)}{P(PAH)} \text{ [ml/min]}$$

---

*V(U) = Urinzeitvolumen [ml/min]; U(PAH) = PAH-Konzentration im Sammelurin [g/l]; P(PAH) = PAH-Konzentration im Plasma [g/l]*

Das Urinzeitvolumen war, wie unter 2.5. beschrieben, bestimmt worden. Die PAH-Konzentrationen der Urin- und Plasmaproben wurden in modifizierter Anthron-Methode mit Azo-Kopplung bestimmt. Hierfür wurden die Proben auf Raumtemperatur gebracht, gut verrührt, die Urinproben im Verhältnis 1:5 mit Aqua dest. verdünnt und mit 0,33M Perchlorsäure (Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim) denaturiert. Nach 10 Minuten wurden die Proben bei 12000rpm 5 Minuten lang zentrifugiert (Mikro 200R, Andreas Hettich GmbH und Co. KG, Tuttlingen) und zum Überstand Chemikalien (allesamt Merck KGaA, Darmstadt) in folgender Reihenfolge gegeben: 1mg/ml Natriumnitrit, 5mg/ml Ammoniumamidosulfonat, 32% Salzsäure. Nach jeder Substanzzugabe wurden die Proben gut verrührt. Schließlich wurde noch die Kupplungsreagenz N-(1-Naphthyl)ethylendiaminodihydrochlorid (Merck KGaA, Darmstadt) zu jeder Probe

hinzugefügt, die Proben wieder gut verrührt und nach exakt 10 Minuten die Reaktion mit Ethanol abs. abgestoppt. Aus dem farblosen PAH entstand eine violette Verbindung. Die Proben wurden dann nochmal bei 12000rpm 1 Minute lang zentrifugiert. Die Überstände wurden in eine 96-well Mikrotiterplatte (BRANDplates<sup>®</sup>, pureGrade<sup>™</sup>, Brand GmbH + CO KG, Wertheim) einpipettiert und die Extinktion des Farbkomplexes bei einer Wellenlänge von 550nm mit einem Photometer (UVM 340, ASYS HITECH GmbH, Austria) gemessen. Die Berechnung der PAH-Konzentrationen in Urin und Plasma erfolgte anhand einer Standardkurve aus Lösungen mit bekannter Menge PAH, die gleich den anderen Proben behandelt wurden.

## 2.7. Real-time RT-PCR

Die Expression der entsprechenden Gene auf Ebene der mRNA wurde mittels real-time PCR (qPCR) bestimmt. Im ersten Schritt dieser Reversen Transkriptase qPCR (RT-qPCR) wurde die RNA der bei -80°C aufbewahrten Proben mit dem RNeasy<sup>®</sup> Mini Kit (Qiagen N.V., Hilden) isoliert. Jeweils maximal 30mg Nierenkortex wurde dabei entsprechend dem zugehörigen Protokoll (RNeasy<sup>®</sup> Mini Handbook, 4<sup>th</sup> Edition June 2012, Qiagen N.V., Hilden) mit einem Glas-Glas Homogenisator (A. Hartenstein GmbH, Würzburg) zerkleinert und mit Spritze und Nadel (Omnifix<sup>®</sup>-F 25G, B-Braun Melsungen AG, Melsungen) homogenisiert, danach über mehrere Zentrifugierungsschritte (Mikro 200R, Andreas Hettich GmbH und Co. KG, Tuttlingen), Zugabe der angegebenen Puffer und 70% Ethanol in einer Säulenadsorption fertig verarbeitet. Die einzelnen Schritte wurden bei Raumtemperatur durchgeführt.

Die RNA-Konzentration wurde photometrisch (NanoDrop 2000c Spectrophotometer, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) bestimmt und anschließend die cDNA nach zugehörigem Protokoll mit dem „First Strand cDNA Synthesis Kit“ (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) im Mastercycler<sup>®</sup> Gradient (Eppendorf AG, Hamburg) erstellt.

Die real-time PCR wurde dann im „CFX Connect™ Real-Time System“ (Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA) unter Verwendung des „SsoFast™ EvaGreen® Supermix“ (Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA) durchgeführt. Die Denaturierung erfolgte dabei über 30s bei 95°C, gefolgt von 40 Zyklen der PCR-Amplifikation (Annealing und Elongation) mit jeweils 5s bei 95°C und 10s bei 60°C. Die Schmelzkurven entstanden im letzten Schritt über 10s bei 65°C, gefolgt von 5s bei 95°C.

Die in der PCR erhaltenen DNA-Produkte wurden nach der fertigen RT-qPCR anhand der Schmelzkurven auf ihre Richtigkeit überprüft. Zudem wurde für jeden eingesetzten Primer die Größe der Produkte mittels Agarosegel-Elektrophorese ermittelt, um gegebenenfalls unspezifische Bindungen und Produkte zu erkennen. In Bezug auf  $\beta$ -Aktin wurde die Quantität der DNA mittels der  $\Delta\Delta C_T$ -Methode berechnet.

Die Primer der untersuchten Genprodukte und die Länge des daraus in der RT-qPCR entstandenen Produktes sind in folgender Tabelle aufgeführt:

<b>Genprodukt</b>	<b>Primer (sense)</b>	<b>Primer (antisense)</b>	<b>Länge in Basenpaaren</b>
<b>iNOS</b>	5'-TTG GGT CTT GTT AGC CTA GTC-3'	5'-TGT GCA GTC CCA GTG AGG AAC-3'	262
<b>eNOS</b>	5'-CAC ACT GCT AGA GGT GCT GGA A-3'	5'-TGC TGA GCT GAC AGA GTA GTA C-3'	109
<b>MCP 1</b>	5'-CCC AGA AAC CAG CCA ACT-3'	5'-TGC TGC TGG TGA TTC TCT TG-3'	224
<b>II-1<math>\beta</math></b>	5'-CGT GGA GCT TCC AGG ATG AG-3'	5'-CGT CAT CAT CCC ACG AGT CA-3'	90
<b>OAT1</b>	5'-AGA GTC ACA GAG CCC TGC AT-3'	5'-GCC CAG GCT GTA GAC ATA GC-3'	402
<b>OAT3</b>	5'-TCC TGG TGG GTA CCA GAG TC-3'	5'-CTG CAT TTC TGA AGG CAC AA-3'	468

<b>β-Aktin</b>	5'-TCT ACA ATG AGC TGC GTG TG-3'	5'-TAC ATG GCT GGG GTG TTG AA-3'	130
----------------	--	--	-----

*Tabelle 2: Primerliste*

## 2.8. Statistik

Die statistischen Tests wurden mit Microsoft® Excel® 2013 (Microsoft Corporation, Redmond, USA) durchgeführt. Die Daten wurden anhand der Varianzanalyse (ANOVA) und dem ungepaarten t-Test untersucht.

Die Grenzen für die Ablehnung der Nullhypothese und somit ein signifikantes Testergebnis wurden, wie allgemein üblich, festgelegt. Ein p-Wert <0.05 wurde als statistisch signifikant und ein p-Wert ≥0.05 als statistisch nicht signifikant gewertet.

In den Diagrammen, die ebenfalls mit Microsoft® Excel® 2013 erstellt wurden, sind die Daten jeweils als Mittelwerte (MW) mit ihren zugehörigen Standardfehlern (SE) angegeben.

### 3. Ergebnisse

Die im Ergebnisteil verwendeten Markierungen in den Abbildungen zeigen einen statistisch signifikanten (p-Wert <0.05) Unterschied zur Sham-Gruppe (\*), beziehungsweise zur Clamp-Gruppe (#). Auf weitere statistische Ergebnisse wird im Text eingegangen.

Analog zu den Abbildungen werden die im Text aufgeführten Mittelwerte mit ihrem zugehörigen Standardfehler (MW ± SE) angegeben.

#### 3.1. Evaluation der globalen Nierenleistung nach ischämischem ANV

Als gängige Parameter der Nierenleistung[14, 25, 70] wurden in einem ersten Schritt die GFR und der RPF der Versuchsgruppen bestimmt.

##### 3.1.1. Glomeruläre Filtrationsrate

Die GFR wurde über die Berechnung der Inulin-Clearance, wie unter 2.5. beschrieben, ermittelt und die Ergebnisse sind in folgender Abbildung dargestellt:

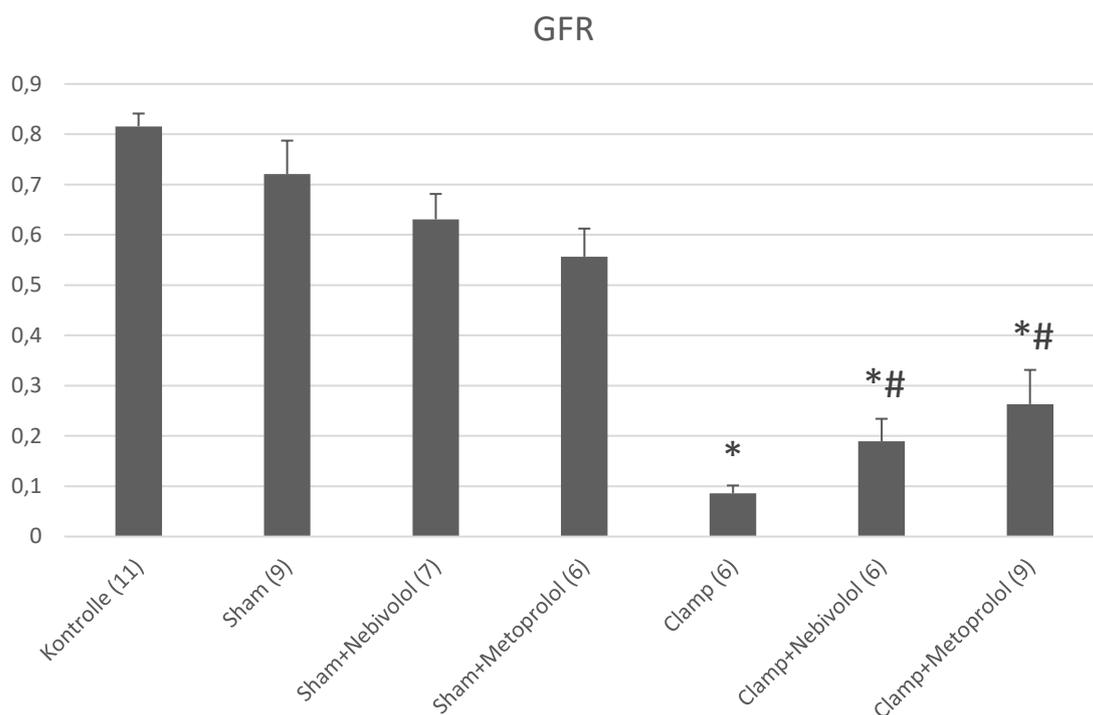
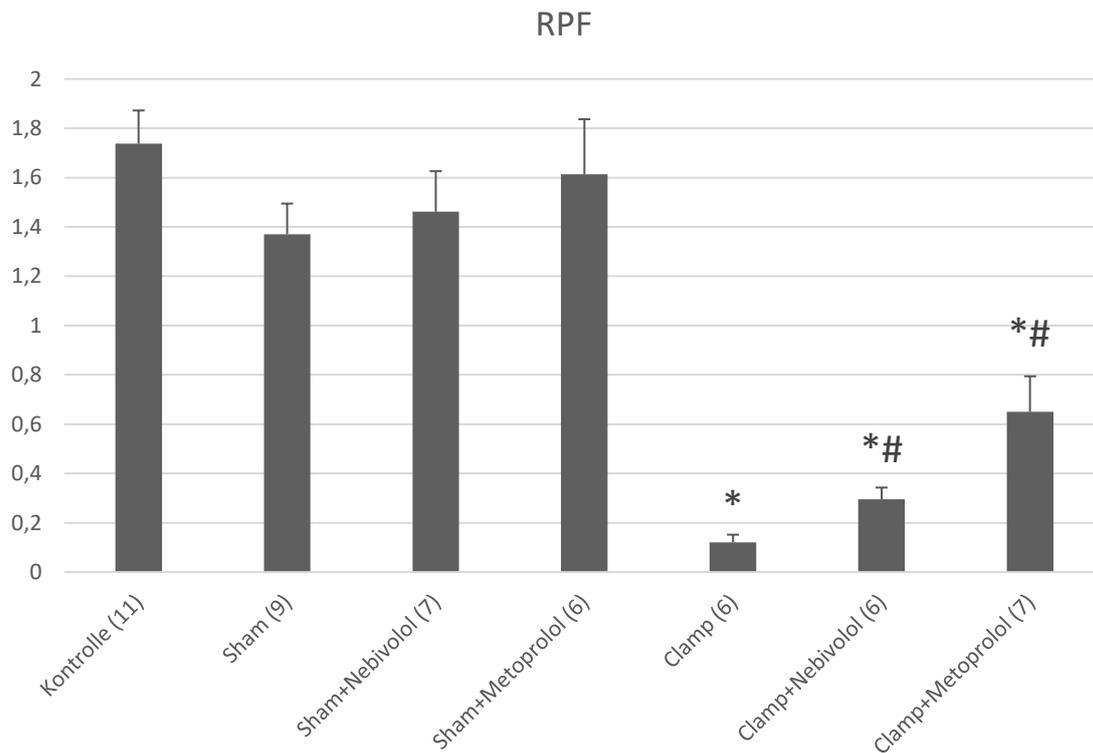


Abbildung 8: Inulin-Clearance pro 100g KG [ml/min]; in Klammern die Anzahl der Versuchstiere (n); \*: statistisch signifikanter Unterschied (p-Wert <0.05) zu Sham; #: statistisch signifikanter Unterschied (p-Wert <0.05) zu Clamp

Der Unterschied zwischen Kontrolle und Sham ist nicht statistisch signifikant, ebenso wie der Unterschied zwischen Sham+Nebivolol/Sham+Metoprolol und Sham nicht statistisch signifikant ist. Die einmalige Gabe der beiden Betablocker scheint also keinen wesentlichen Effekt auf die GFR nierengesunder Ratten zu haben. Das Clamping der Nierenarterien führt jedoch 24 Stunden postoperativ zu einem drastischen Abfall der GFR von  $0,72 \pm 0,06$  ml/min (Sham) auf  $0,09 \pm 0,02$  ml/min ( $p < 0,001$ ). Die GFR der beiden Gruppen Clamp+Nebivolol ( $0,19 \pm 0,04$  ml/min), so wie Clamp+Metoprolol ( $0,26 \pm 0,07$  ml/min) liegt zwar ebenfalls signifikant unter der GFR der Sham-Gruppe, ist jedoch andererseits signifikant höher als die GFR der Clamp-Gruppe. Es ist auch weiterhin ein statistischer Unterschied zwischen den Clamp+Betablocker-Gruppen zu ihren jeweiligen Sham+Betablocker-Gruppen auszumachen. Voneinander unterscheiden sich die beiden Interventionsgruppen (Clamp+Betablocker) nicht signifikant ( $p = 0,464$ ).

### 3.1.2. Renaler Plasmafluss

Der RPF wurde über die Berechnung der PAH-Clearance, wie unter 2.6. beschrieben, ermittelt und die Ergebnisse sind in folgender Abbildung dargestellt:



*Abbildung 9: PAH-Clearance pro 100g KG [ml/min]; in Klammern die Anzahl der Versuchstiere (n); \*: statistisch signifikanter Unterschied (p-Wert <0.05) zu Sham; #: statistisch signifikanter Unterschied (p-Wert <0.05) zu Clamp*

Die hier dargestellten Ergebnisse des RPF zeichnen ein der GFR ähnliches Bild. Der Unterschied zwischen Kontrolle und Sham ist auch hier nicht statistisch signifikant. Da sich auch die Gruppen Sham+Nebivolol/Sham+Metoprolol nicht signifikant von Sham unterscheiden haben die Betablocker offensichtlich keinen größeren Effekt auf den RPF bei den Tieren, an denen keine Intervention in Sinne eines Clamping stattgefunden hat. Dieser Eingriff führt jedoch zu einer Reduktion des RPF am 1. postoperativen Tag von  $1,37 \pm 0,12$  ml/min (Sham) auf  $0,12 \pm 0,03$  ml/min (Clamp,  $p < 0,001$ ). Die Gabe je eines Betablockers bewirkt auch in

diesem Fall einen Anstieg des RPF auf  $0,30 \pm 0,05$  ml/min (Clamp+Nebivolol) und auf  $0,65 \pm 0,14$  ml/min (Clamp+Metoprolol), der sich signifikant von dem Wert der Clamp-Gruppe abhebt, ohne jedoch ein statistisch gleiches Niveau im Vergleich zu den Sham±Betablocker-Gruppen zu erreichen. Untereinander unterscheiden sich die beiden Clamp+Betablocker-Gruppen nicht signifikant ( $p = 0,067$ ), jedoch ist – wie auch schon bei der GFR – eine Tendenz zur besseren Nierenleistung bei der Clamp+Metoprolol-Gruppe sichtbar.

### 3.2. Expression einzelner Gene nach ischämischem ANV

Um mögliche Angriffspunkte der Betablocker zu analysieren, wurde die Expression einzelner Gene, die in der Einleitung als pathophysiologisch wichtig beschrieben wurden, mittel RT-qPCR bestimmt.

#### 3.2.1. iNOS und eNOS

Die Expression der iNOS auf Ebene der mRNA, die wie unter 2.7. beschrieben ermittelt wurde, ist in folgender Abbildung dargestellt:

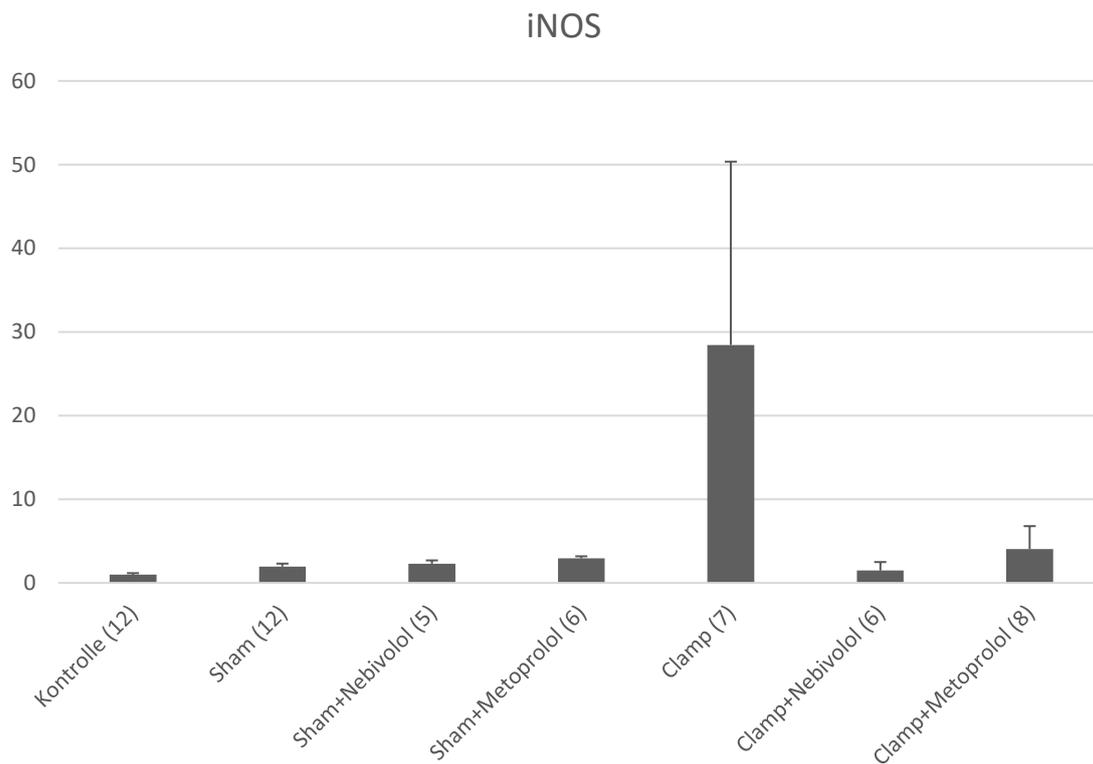


Abbildung 10: iNOS mRNA-Expression bezogen auf  $\beta$ -Aktin; Kontrolle = 1; in Klammern die Anzahl der Versuchstiere (n)

Die iNOS mRNA-Expression ist der einzige untersuchte Fall, bei dem die Grundannahme, dass sich Kontrolle und Sham nicht signifikant unterscheiden, nicht zutrifft, denn Sham entspricht gegenüber jener Gruppe einem Anstieg auf 195% ( $p = 0,030$ ). Zwischen den übrigen Gruppen gibt es dann keine statistisch signifikanten Unterschiede mehr, auch nicht in Bezug auf die Clamp-Gruppe, deren Mittelwert sich zwar mit 28,44 deutlich von den übrigen absetzt, die aber auch einen Standardfehler von 21,92 aufweist. Die Unterschiede der Mittelwerte zwischen Clamp und Clamp+Nebivolol ( $p = 0,159$ ) und zwischen Clamp und Clamp+Metoprolol ( $p = 0,146$ ) erreichen keine Signifikanz, weiter ist auch keine relevanter Unterschied zwischen den beiden Clamp+Betablocker-Gruppen ( $p = 0,483$ ) auszumachen. Trotz der erwarteten, deutlichen Expressionszunahme der iNOS, kann daher leider in diesem Fall keine genaue Aussage getroffen werden.

Demgegenüber steht die Expression der eNOS, die in folgender Abbildung dargestellt ist:

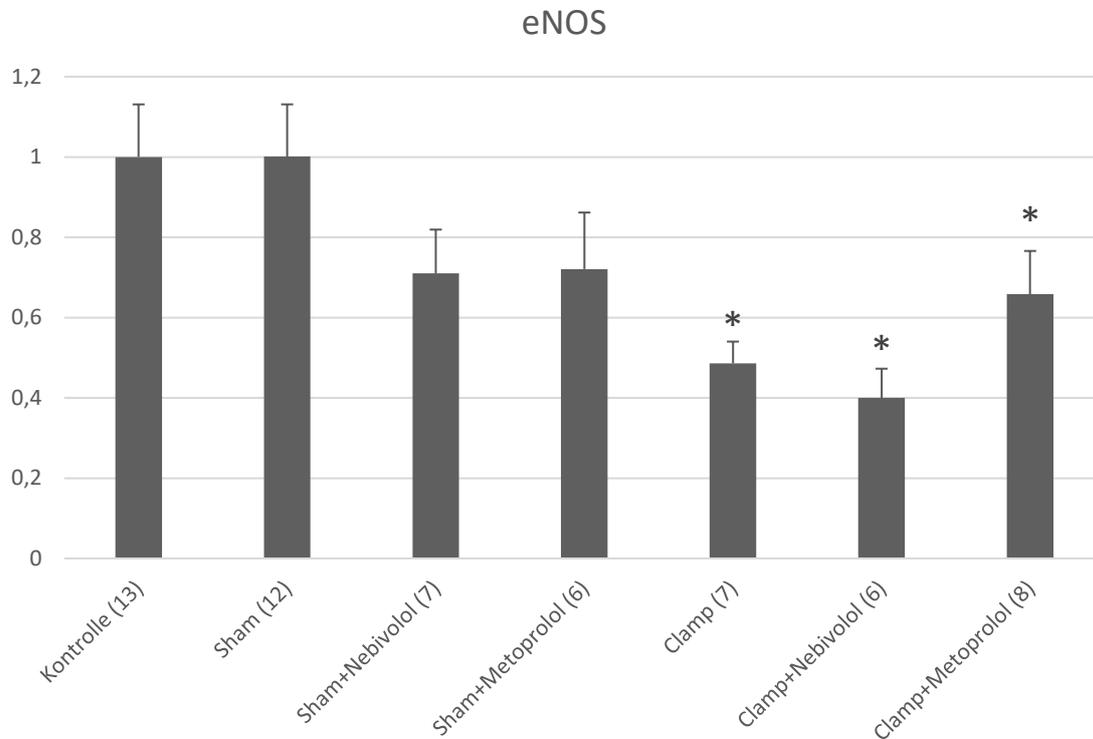


Abbildung 11: eNOS mRNA-Expression bezogen auf  $\beta$ -Aktin; Kontrolle = 1; in Klammern die Anzahl der Versuchstiere (n); \*: statistisch signifikanter Unterschied ( $p$ -Wert  $<0.05$ ) zu Sham

Hier ist der Unterschied zwischen Kontrolle und Sham wieder nicht statistisch signifikant. Trotz der Tendenz zu verringerter Expression der eNOS mRNA liegen die Gruppen Sham+Nebivolol und Sham+Metoprolol statistisch nicht unter der Sham-Gruppe. Die Gruppen Clamp $\pm$ Betablocker unterscheiden sich allesamt signifikant von Sham im Sinne einer reduzierten mRNA-Expression. Dies spiegelt im Wesentlichen die Grundannahme wider, jedoch kann die Gabe eines der Betablocker nach Clamping keine signifikante Steigerung gegenüber Clamping alleine herstellen. Die beiden Interventionsgruppen unterscheiden sich auch voneinander nicht signifikant ( $p = 0,112$ ). Clamp+Nebivolol unterscheidet sich von seiner zugehörigen Sham-Gruppe (Sham+Nebivolol) signifikant ( $p = 0,030$ ), für Metoprolol ist diesbezüglich jedoch kein Unterschied nachweisbar.

### 3.2.2. MCP 1 und Il-1 $\beta$

Die Expression von MCP 1 wurde wie unter 2.7. beschrieben bestimmt und ist in folgender Abbildung dargestellt:

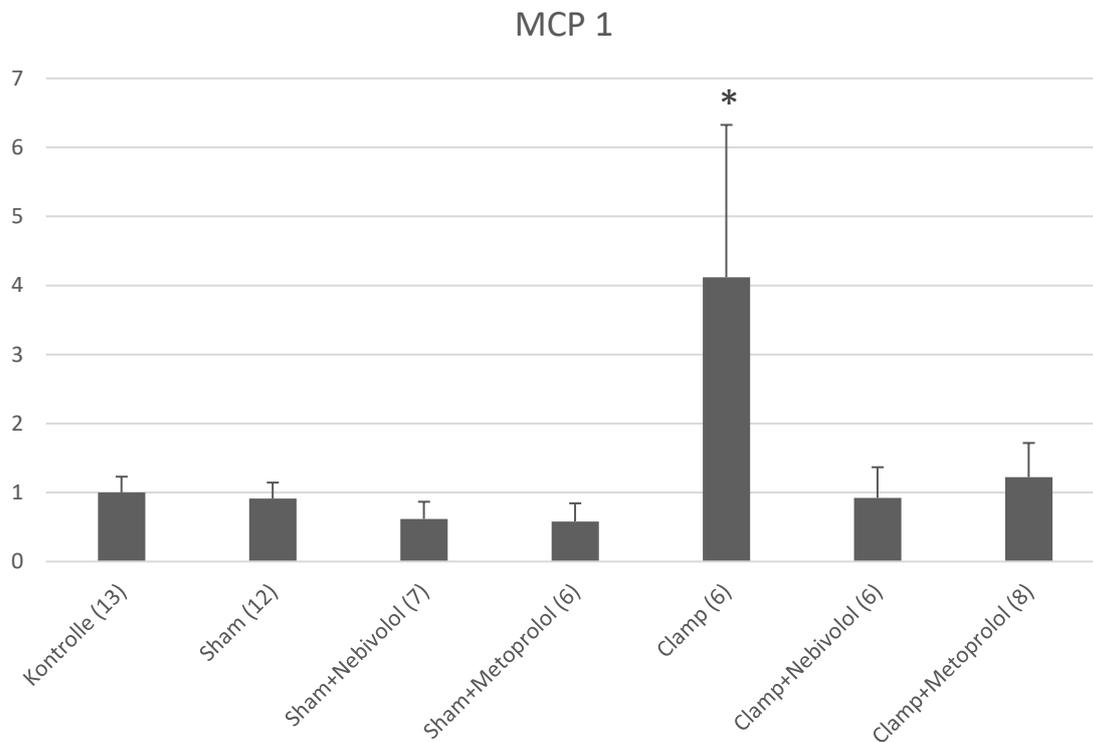


Abbildung 12: MCP 1 mRNA-Expression bezogen auf  $\beta$ -Aktin; Kontrolle = 1; in Klammern die Anzahl der Versuchstiere (n); \*: statistisch signifikanter Unterschied ( $p$ -Wert  $<0.05$ ) zu Sham

Kontrolle und Sham unterscheiden sich auch für MCP 1 nicht statistisch signifikant voneinander. Sham+Nebivolol und Sham+Metoprolol zeigen keinen signifikanten Unterschied zu Sham, was hier wieder einen fehlenden Effekt auf das entsprechende Gen im Ausgangszustand kennzeichnet. Der signifikante Anstieg von MCP 1 einen Tag nach Clamping auf 451% gegenüber Sham ( $p = 0,038$ ) kann durch die Gabe von sowohl Nebivolol, als auch Metoprolol derart reduziert werden, dass statistisch kein Unterschied mehr zu Sham nachweisbar ist. Untereinander unterscheiden sich die beiden Clamp+Betablocker-Gruppen nicht signifikant.

Die mRNA-Expression von Il-1 $\beta$  ist in folgender Abbildung dargestellt:

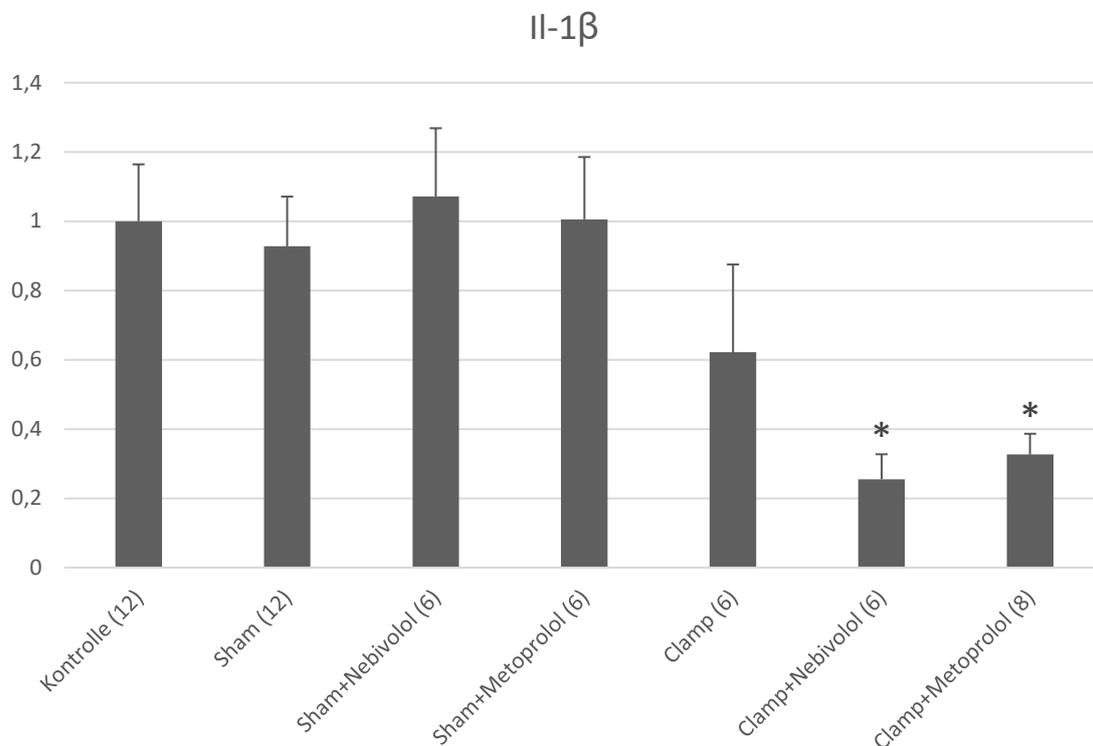


Abbildung 13: Il-1 $\beta$  mRNA-Expression bezogen auf  $\beta$ -Aktin; Kontrolle = 1; in Klammern die Anzahl der Versuchstiere (n); \*: statistisch signifikanter Unterschied ( $p$ -Wert  $<0.05$ ) zu Sham

Kontrolle und Sham unterscheiden sich nicht signifikant voneinander und auch hier hat die Gabe der beiden Betablocker an Sham-Tieren keinen statistisch signifikanten Effekt. Das Clamping führt in Bezug zu Sham erstaunlicherweise zu einer Reduktion der Il-1 $\beta$  Expression auf 59%, jedoch ohne signifikant zu sein ( $p = 0,303$ ). Il-1 $\beta$  liegt in den Gruppen Clamp+Nebivolol und Clamp+Metoprolol signifikant unter Sham, jedoch ist statistisch kein Unterschied zu Clamp festzustellen, auch wenn die Gabe eines Betablockers das Cytokin auf mRNA-Ebene tendenziell zu supprimieren scheint. Untereinander unterscheiden sich Clamp+Nebivolol und Clamp+Metoprolol nicht statistisch voneinander.

### 3.2.3. OAT1 und OAT3

Die Expression der organischen Anionentransporter OAT1 und OAT3 wurde, wie oben aufgeführt, bestimmt und ist in den folgenden Abbildungen gezeigt:

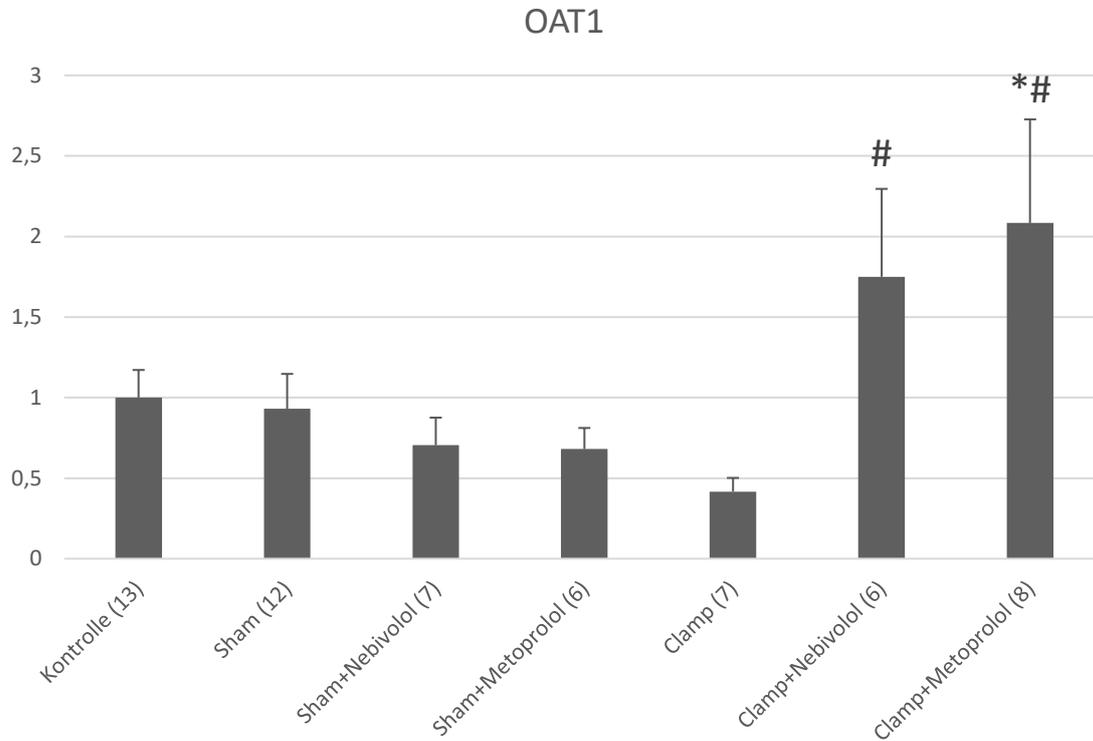


Abbildung 14: OAT1 mRNA-Expression bezogen auf  $\beta$ -Aktin; Kontrolle = 1; in Klammern die Anzahl der Versuchstiere (n); \*: statistisch signifikanter Unterschied ( $p$ -Wert  $<0.05$ ) zu Sham; #: statistisch signifikanter Unterschied ( $p$ -Wert  $<0.05$ ) zu Clamp

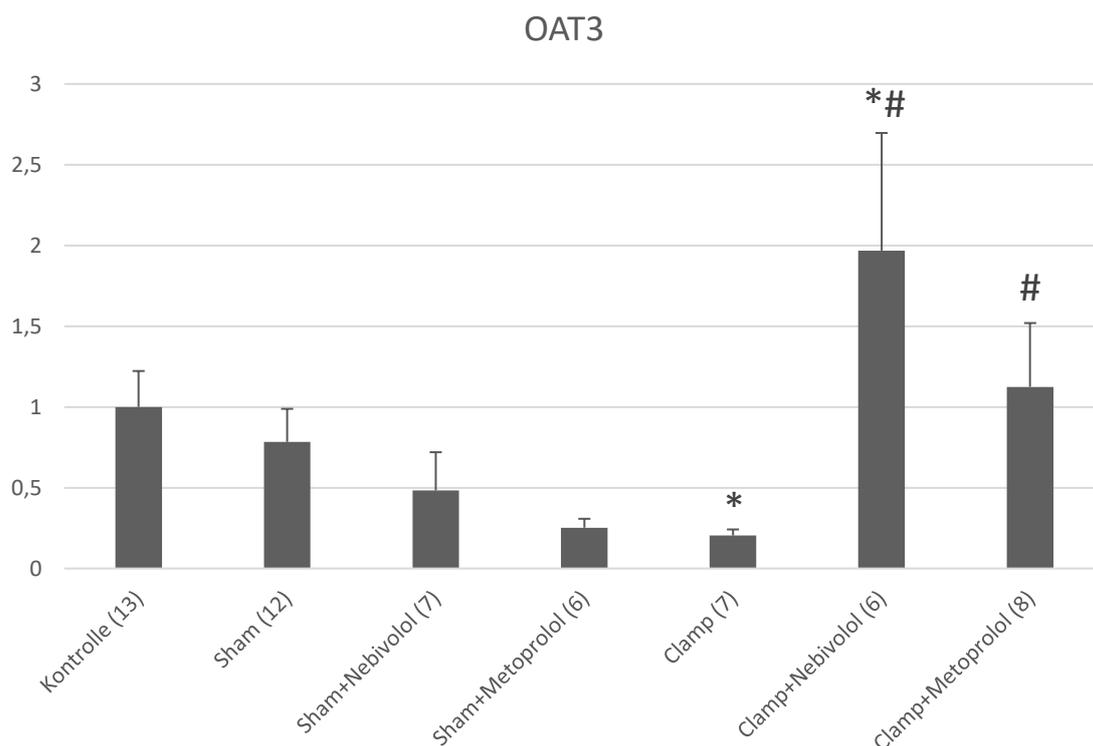


Abbildung 15: OAT3 mRNA-Expression bezogen auf  $\beta$ -Aktin; Kontrolle = 1; in Klammern die Anzahl der Versuchstiere (n); \*: statistisch signifikanter Unterschied ( $p$ -Wert  $<0.05$ ) zu Sham; #: statistisch signifikanter Unterschied ( $p$ -Wert  $<0.05$ ) zu Clamp

In beiden Fällen unterscheiden sich Kontrolle und Sham nicht signifikant voneinander. Auch der Unterschied von Sham zu Sham+Nebivolol/Sham+Metoprolol ist sowohl bei OAT1, als auch bei OAT3 nicht signifikant, wenngleich es tendenziell zu einer Reduktion der Transporterexpression, besonders durch Metoprolol, zu kommen scheint. Insgesamt ist der Einfluss auf die Genexpression im scheinbehandelten Tier aber offenbar nicht wesentlich. Das Clamping führt in Bezug auf die Sham-Gruppe als Ausgangswert zu einem Abfall der mRNA auf 45% (OAT1), beziehungsweise 26% (OAT3). Dieser Wert ist jedoch nur für OAT3 signifikant ( $p = 0,030$ ), während er für OAT1 diese Voraussetzung knapp verfehlt ( $p = 0,056$ ). Die Gabe eines Betablockers bewirkt nach Clamping eine im Vergleich mit der Clamp-Gruppe statistisch signifikante Heraufregulierung der Transporterexpression, nämlich für

OAT1 auf 188% (Clamp+Nebivolol) und auf 224% (Clamp+Metoprolol), beziehungsweise für OAT3 auf 251% (Clamp+Nebivolol) und auf 143% (Clamp+Metoprolol), jeweils in Bezug auf die Sham-Gruppe. Gegenüber Sham ist diese Steigerung sogar signifikant in der Gruppe Clamp+Metoprolol bei OAT1 ( $p = 0,040$ ) und in der Gruppe Clamp+Nebivolol bei OAT3 ( $p = 0,040$ ).

## 4. Diskussion

Die im vorausgegangenen Teil beschriebenen Ergebnisse sollen im Folgenden weiter erörtert werden.

### 4.1. Methoden

Die in diesem Experiment verwendeten Sprague Dawley<sup>®</sup> Ratten wurden entsprechend dem deutschen Tierschutzgesetz und den Empfehlungen der FELASA (Federation of European Laboratory Animal Science Associations) Kategorie B, sowie den Empfehlungen des Europarates vom 30.11./03.12.1993, wie weiter oben beschrieben, gehalten, operiert und getötet. Das zugrunde liegende Verfahren zur Induktion des ischämischen ANV wurde bereits vielfach in unserer eigenen Arbeitsgruppe, wie auch von externen Gruppen angewandt und kann daher als etabliert angesehen werden.[21, 43, 44, 71, 72] Die gute Reproduzierbarkeit und Anwendbarkeit dieses Modells warmer Ischämie mit Reperfusion zeigt sich auch darin, dass es in >40% der Studien zum ANV verwendet wird.[73] In unserem Modell einer warmen Ischämie über 45 Minuten und anschließender Reperfusion kommt es zu nekrotischen Veränderungen im proximalen Cortex und im Außenstreifen des Nierenmarks.[71] Zu beachten ist, dass die hier untersuchten weiblichen Ratten, verglichen mit ihren männlichen Artgenossen, ein ischämisches ANV relativ gesehen offensichtlich besser überstehen.[74]

Trotz der Analogien zum ANV einer menschlichen Niere gibt es durchaus auch Unterschiede, die erwähnt werden sollten: Zu einer kompletten Ischämie mit Reperfusion der Nieren kommt es beim Menschen lediglich im Rahmen von Nierentransplantationen, wobei hier die Organe üblicherweise gespült und vorübergehend gekühlt werden („kalte Ischämie“) oder in seltenen Fällen bei länger andauernden Reanimationen sowie einem ausgeprägten hämorrhagischen Schock („warme Ischämie“).[71] Zudem ist ein ANV bei menschlichen Patienten oft mit Komorbiditäten assoziiert und geht nicht zwingend auf ein einzelnes Ereignis zurück.[75] Bei hospitalisierten Patienten ist

Sepsis der häufigste Grund für ein ANV und nicht die Okklusion der Nierenarterie.[10] Dies bedeutet zwar einerseits, dass Erkenntnisse aus Tierexperimenten niemals unmittelbar mit den pathophysiologischen Vorgängen im Menschen gleichgesetzt werden können, andererseits erlauben sie uns ein derart komplexes System wie das der Niere realitätsgetreu zu beobachten und zu untersuchen. Darüber hinaus können die Ergebnisse eines monokausal induzierten ANV im Vergleich mit Kontroll- und Sham-Gruppen spezifisch auf Störungen in der Niere zurückgeführt werden, womit der Einfluss weiterer Faktoren auf ein Mindestmaß reduziert werden kann. Es besteht also Hoffnung mit Hilfe der Grundlagenforschung Abläufe des ANV weiter aufzudecken und somit schließlich neue diagnostische und therapeutische Ansätze zu etablieren.

#### 4.2. Dosierung der Medikamente

Metoprolol wurde in den Experimenten in einer einmaligen oralen Dosis von 50mg verabreicht. Dies entspricht einer üblichen Einmaldosis beim Menschen.[76] Nebivolol wurde in den Experimenten in einer einmaligen oralen Dosis von 5mg verabreicht. Auch dies entspricht der üblichen mittleren oralen Tagesdosis beim Menschen.[76] Aufgrund der oben beschriebenen Pharmakokinetik konnten wir davon ausgehen, dass die beiden Präparate im hier erfassten Zeitfenster von 24 Stunden nach Induktion der Ischämie wirkten. Im Fall von Nebivolol hat sich überdies in Voruntersuchungen (in dieser Arbeit nicht präsentiert) mit verschiedenen Stoffmengen (2,5mg/5mg/10mg) die Dosis 5mg als die wirksamste herausgestellt. Der Vergleich mit den Sham-Tieren zeigt, dass die verwendete Dosierung keinen wesentlichen Einfluss auf die Nierenfunktion im Ausgangszustand hat. Eine ähnliche orale Dosis (60mg Metoprolol, beziehungsweise 6mg Nebivolol) wurde auch in einem anderen Experiment an Ratten mit der Frage nach einem Effekt auf chronisches Nierenversagen gewählt.[53]

#### 4.3. Die Nierenfunktion nach ANV und Einsatz der Betablocker Nebivolol oder Metoprolol

Die GFR gilt allgemein als der Wert, der die Nierenleistung insgesamt am besten widerspiegelt und wird im klinischen Alltag oft mit Hilfe des Serumkreatinins abgeschätzt.[9] Von Bedeutung ist auch der RPF, der einen weiteren Hinweis auf die renale Durchblutungssituation gibt. Im ANV geht die hämodynamische Autoregulation, die den Perfusionsdruck der Nieren normalerweise bei circa 65mmHg hält, verloren.[9] Um ein exaktes und verlässliches Ergebnis zu erhalten, haben wir daher für diese Arbeit die GFR (wie auch den RPF) nach ihren physiologischen Grundprinzipien berechnet. Dies ist weiter oben ausführlich beschrieben.

Die GFR nach Clamping der Nierenarterien konnte in unserem Experiment durch die Gabe der Betablocker, verglichen mit der Gabe von Kochsalzlösung, verdoppelt, beziehungsweise im Falle von Metoprolol, fast verdreifacht werden. Dieses Ergebnis unterstützt die Hypothese, dass eine Reduktion des Sympathikotonus positive Effekte auf die Niere haben kann. Die Gabe der Betablocker konnte allerdings nicht zu einer Egalisierung der GFR mit den jeweils zugehörigen Sham-Gruppen führen.

Es konnte in verschiedenen Studien gezeigt werden, dass die Reninaktivität im ANV erhöht ist[77, 78],  $\beta$ 1-selektive Betablocker wie Nebivolol oder Metoprolol senken die Reninsekretion hingegen.[29] Auch eine deutliche Erhöhung von Angiotensin II konnte im Ischämie-Reperusionsmodell an Ratten gezeigt werden[79] und so wurden vor dem Hintergrund eines gesteigerten RAAS Experimente durchgeführt, die dieses an verschiedener Stelle blockieren. Kontogiannis et al.[79] konnten so in einer Studie warmer Ischämie durch bilaterales Clamping der Nierengefäße an Sprague Dawley® Ratten zeigen, dass Losartan, ein AT1-Rezeptor-Blocker, positive Effekte auf den Serumkreatininwert hat. Diese wurden allerdings erst 72 Stunden nach Reperfusion sichtbar. Ein Unterschied zur Kontrollgruppe konnte nach 24 Stunden noch nicht ausgemacht werden. Das Experiment von Kim et al.[65] bestätigt dieses Ergebnis, wonach sowohl Losartan als auch der ACE-Hemmer Enalapril die GFR 24 Stunden nach

bilateralem Clamping an Kaninchen nicht signifikant verbessern konnten. Beide Autoren werfen die Frage nach weiteren Proteasen auf, die Angiotensin I unabhängig vom ACE zu Angiotensin II spalten könnten. Es ist tatsächlich bekannt, dass die Serinproteasen Chymase und Cathepsin G eben diesen peptidolytischen Schritt bewerkstelligen können.[80-82] Eine Blockade des RAAS mit Betablockern an vorgeschalteter Stelle, nämlich auf Ebene der Reninsekretion, sollte hiervon nicht betroffen sein. Iaina et al.[83] konnten konsequenterweise im warmen Ischämiemodell an Ratten eine deutliche Reduktion des Kreatinins und des Harnstoffes im Serum 24 Stunden nach ANV zeigen, wenn sie die Tiere zum Zeitpunkt des ANV mit Propranolol, einem unselektiven Betablocker, behandelten. Zur Reduktion dieser Parameter konnte in einem anderen Experiment auch der Einsatz von Metoprolol bei Cyclosporin A-geschädigten Nieren führen.[84] Ebenso konnte von Gandhi et al.[85] gezeigt werden, dass auch Nebivolol einen ähnlich positiven Einfluss auf das ischämische ANV bei Ratten hat. Interessanterweise war der Effekt von Atenolol, einem  $\beta$ 1-selektiven Betablocker ohne NO-freisetzende Wirkung, in diesem Versuch bezüglich Kreatinin und Harnstoff nahezu identisch. In den beiden zuletzt genannten Experimenten, wurden die Betablocker jedoch schon vor der Induktion des Nierenschadens verabreicht. Für einen klinischen Ansatz zur Therapie des ANV ist dies weitestgehend unbrauchbar, weswegen wir uns entschieden haben, die Präparate jeweils kurz nach Eintreten des ANV zu applizieren. Im Gegensatz dazu konnten in einem Modell chronischer Niereninsuffizienz an Ratten weder Nebivolol noch Metoprolol erhöhte Kreatinin oder Harnstoffwerte günstig beeinflussen.[53] Nebivolol senkte hier allerdings das Ausmaß der Albuminurie.

In das Gesamtbild dieser Erkenntnisse fügt sich auch das Ergebnis eines Experimentes von Linz et al.[67] ein, in dem die GFR nierenkranker Ratten durch selektive sympathische Denervierung verbessert werden konnte. Über die Reninfreisetzung hinaus führt die sympathische Aktivität jedoch auch über  $\alpha$ -Rezeptoren zu erhöhtem Gefäßwiderstand und somit zu verringerter GFR und RPF der Nieren[62], wovon in diesem Versuch nur der erste Teil abgebildet sein kann. Um die Veränderungen des RPF abzubilden, die vom RAAS (Angiotensin

II) hervorgerufen werden, haben wir jedoch auch hier mittels der PAH-Clearance die Nierendurchblutung gemessen. Nachdem das Clamping den RPF auf 9% seines Ausgangswertes (Sham) reduzierte, konnte die Gabe beider Betablocker den Wert statistisch signifikant anheben. Wie schon bei der GFR war dabei Metoprolol tendenziell besser wirksam, setzte sich aber nicht signifikant von Nebivolol ab.

Die GFR und der RPF der Sham-Tiere waren von der Applikation je eines Betablockers in unserem Versuch nicht verändert. Dies lässt sich mit der Beobachtung eines Experimentes von El-Gowilly et al.[84] erklären, bei dem Metoprolol die basale Reninaktivität nicht beeinflusste, jedoch eine erhöhte Aktivität nach Cyclosporin A-induziertem Nierenschaden senkte. Für das am  $\beta$ 1-Rezeptor wirkungsgleiche Nebivolol kann dieselbe Annahme gelten. Dieses Erkenntnis ist nicht zuletzt wichtig für die Beurteilung der Dosis der Pharmaka, da Betablocker (in zu hoher Dosierung) akut die Ventrikelfunktion[29] und somit die Nierendurchblutung verschlechtern können.

Da es bezüglich der beiden Betablocker keine Unterschiede im Hinblick auf die Beeinflussung von GFR oder RPF bei Sham-Tieren gab, scheint die Eigenschaft von Nebivolol als NO-Donor keine wesentliche Rolle hierfür im Grundzustand zu spielen.

#### 4.4. Veränderungen der iNOS und eNOS Aktivität

Bei Untersuchung der iNOS-Expression 24 Stunden nach ischämischem ANV zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen der Sham-Gruppe und den Interventionsgruppen, auch wenn das Muster der Veränderungen den Erwartungen entspricht. Der akute Nierenschaden führt, wie vielfach beschrieben[20, 21, 86-89], zu einer erhöhten iNOS auf mRNA und auf Proteinebene (Letzteres hier nicht nachgeprüft). Auffällig ist der große Standardfehler, vor allem der Clamp-Gruppe, der auch schon in einer früheren Publikation unserer Arbeitsgruppe[21] gegenwärtig war und vermuten lässt, dass es bezüglich der iNOS-Expression in der Ratte große interindividuelle

Unterschiede gibt. Bei entsprechend größerer Versuchszahl (n) ist aber zu vermuten, dass sich Clamp signifikant von Sham abheben sollte. Interessant ist jedoch, dass es keinen Unterschied zwischen den Gruppen Clamp+Nebivolol und Clamp+Metoprolol gibt. Der Aspekt der NO-freisetzenden Wirkung von Nebivolol scheint also 24 Stunden nach Clamping keinen wesentlichen Effekt auf das NOS-System zu haben, denn auch bei Untersuchung der eNOS mRNA-Expression sind die Gruppen statistisch gleich. Andererseits finden sich nach der Gabe von Metoprolol ähnliche Werte wie nach der Gabe von Nebivolol, was auf eine mögliche Beeinflussung durch  $\beta$ -Rezeptoren hindeutet. Hinsichtlich der eNOS spricht für diese Annahme auch, dass sich durch die Gabe von Metoprolol der Unterschied zwischen Clamp und Sham egalieren lässt. Die beobachtete Herabregulierung der eNOS nach Clamping steht im Einklang mit Ergebnissen unserer[90] und externer[89] Arbeitsgruppen, jedoch konnte an anderer Stelle auch eine Heraufregulierung auf Proteinebene[21] und mRNA-Ebene[88] beschrieben werden. Entscheidend für das ANV erscheint jedoch, wie in der Einleitung dargelegt, das relative Verhältnis der beiden NOS zueinander, das durch NO-Donoren im Prinzip günstig beeinflusst werden kann.[20, 21, 69]

Der vasodilatatorische Effekt von NO beruht nicht nur auf einer direkten Wirkung an der glatten Gefäßmuskulatur, sondern auch auf einer Senkung des Sympathikotonus im ZNS.[91] Umgekehrt kann ein NO-Mangel über das sympathische Nervensystem eine vermehrte Reninsekretion vermitteln[85, 92] und den Effekt von Angiotensin II verstärken.[93] Ito et al.[92] konnten so in einem Experiment an einem einzelnen Glomerulus zeigen, dass die Blockade der NO-Synthese die von Angiotensin II vermittelte Vasokonstriktion des Vas afferens verstärkt und verlängert. Hinsichtlich der Reninsekretion und deren Inhibition durch selektive Blockade der  $\beta$ 1-Rezeptoren wäre es denkbar, dass sie in unserem Experiment schon auf ein derart niedriges Niveau abgesenkt war, dass eine zusätzliche Modulation über das NO-System keinen messbaren Effekt mehr hatte. Das ist aber ein Erklärungsansatz, der nur diesen einen Aspekt berücksichtigt, wohingegen die Effekte von eNOS und iNOS (siehe 1.2.1.) vielfältiger sind. Hierzu zählen neben den vasodynamischen Einflüssen u.a. eine Verringerung des oxidativen Stresses (ROS) und der Gefäßentzündung.[58]

Es konnte in Experimenten weiter gezeigt werden, dass auch Betablocker in das NOS-System eingreifen. Funovic et al.[94] fanden in einer Untersuchung an Aorten, dass die vorausgehende Behandlung mit Metoprolol das Verhältnis von aus eNOS freigesetztem NO zu Peroxinitrit günstig beeinflusst und überdies mehr NO produziert wird. Die Autoren führen an, dass das Pharmakon aufgrund seiner ausgeprägten Lipophilie intrazellulär oxidative Prozesse verringern könnte. Im Gegensatz dazu stehen die Beobachtungen von Ladage et al.[54], die eine Zunahme der eNOS-vermittelten NO-Produktion durch Nebivolol, nicht aber Metoprolol, an menschlichen Endothelzellen beschrieben haben. Broeders et al.[55] kommen zu derselben Erkenntnis, indem sie zeigen, dass von beiden Präparaten lediglich Nebivolol NO-freisetzend wirkt und das erst nach hepatischer Metabolisierung bei der die unter anderem verantwortlichen  $\beta$ -agonistischen Produkte entstehen. Dies unterstreicht nebenbei die Notwendigkeit eines in vivo Modells zur Untersuchung des hier behandelten Themas. Bei Betrachtung der Studienlage ist zu bedenken, dass die Wirkung der  $\beta$ -Blocker durchaus auch organspezifisch sein kann. Dass Nebivolol auch tatsächlich an mesangialen Zellen des Glomerulums einen vasodilatierenden Effekt hat, konnten Kalinowski et al.[56] nachweisen. Mason et al.[95] konnten experimentell zeigen, dass sowohl Nebivolol als auch Metoprolol das NO/Peroxinitrit-Verhältnis in aortalen und glomerulären Endothelien anheben konnten, wohingegen dies für Metoprolol nur in der Niere der Fall war.

Die verringerte eNOS Expression ist nur eine Ursache des geschilderten NO-Mangels. So schreiben Sullivan et al.[96] richtigerweise, dass eine „entkoppelte“ eNOS, die anstelle NO vermehrt Superoxid ( $O_2^-$ ) produziert, welches dann weiter unter zusätzlichem NO-Verbrauch zu Peroxinitrit reagiert, ein weiterer Grund für einen funktionellen NO-Mangel ist. Diese Tatsache wird in unserem Experiment nicht vollständig abgebildet, da hierfür noch NO und ROS separat erfasst werden müssten.

Insgesamt konnte das Wirkprinzip von Nebivolol oder Metoprolol auf die eNOS/iNOS Aktivität mit unserer Arbeit noch nicht nachgewiesen werden. Vor allem der Ansatz mit Nebivolol bleibt aber weiterhin spannend, da eine Reihe an

Experimenten auf mögliche, vorteilhafte Wirkungen hinweisen. Zu beachten ist, dass sich die Untersuchungen hierzu nicht nur mit der renalen Vasomotorik im Speziellen, sondern mit den Effekten auf isolierte Endothelzellen oder die Aorta beschäftigen.

#### 4.5. Mechanismen der Entzündung nach ANV und Einsatz von Nebivolol oder Metoprolol

Das Vorliegen entzündlicher Prozesse in der Pathophysiologie des ANV, speziell auch nach einem Ischämie/Reperfusionsschaden, wird in der Literatur zahlreich dargelegt[2, 4, 10, 33, 97] und ist auch weiter oben ansatzweise beschrieben. Um hierzu sowohl Einblick in Vorgänge der erworbenen als auch angeborenen Immunität zu erhalten, haben wir die Expression von MCP 1 und IL-1 $\beta$  untersucht. MCP 1 spielt dabei eine herausragende Rolle, da es unter den Chemokinen der CC-Familie in der Niere den größten Anteil an chemotaktischer Aktivität vermittelt und somit für die Migration weißer Blutkörperchen nach Ischämie verantwortlich ist.[98]

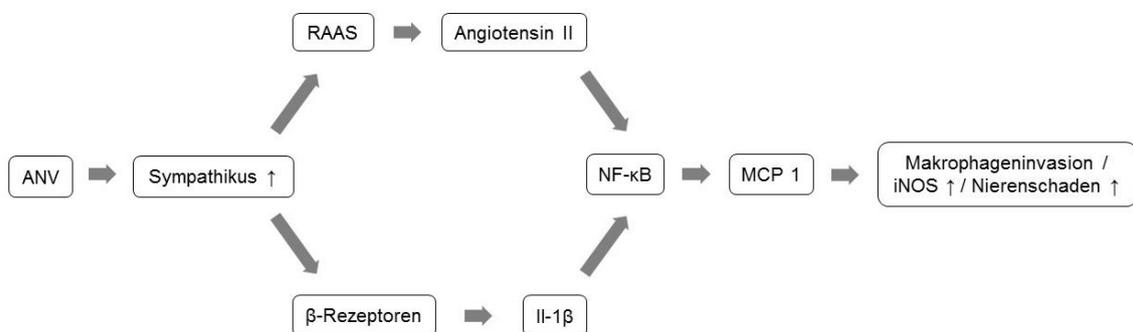
Im Falle des Cytokins MCP 1 konnte 24 Stunden nach Ischämie ein Anstieg der mRNA-Expression auf mehr als das 4,5-fache des Ausgangswertes (Sham) verzeichnet werden, was in guter Übereinstimmung mit anderen Veröffentlichungen ist.[35, 99, 100] Die Applikation von Nebivolol und Metoprolol konnten die Überexpression gleichermaßen reduzieren und zwar auf einen Wert, der sich statistisch nicht mehr von den Sham-Gruppen unterscheidet. Zwischen den Gruppen Clamp+Nebivolol und Clamp+Metoprolol gab es keinen Unterschied. Das spricht dafür, dass dieser Effekt den  $\beta$ -blockierenden Eigenschaften der Pharmaka und nicht der NO-freisetzenden Wirkung von Nebivolol zuzuschreiben ist. Eine Erklärung hierfür liefert die Beobachtung, dass neben dem komplexen Zusammenspiel der Cytokine auch Angiotensin II in dieses System eingreift. Ruiz-Ortega et al.[101] konnten in vitro an mesangialen Zellen zeigen, dass Angiotensin II über den Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B die MCP 1 mRNA-Expression steigert. Demgegenüber stehen die Untersuchungen von

Wolf et al.[102, 103] die herausfanden, dass die MCP 1-Expression nur von Nebivolol, nicht aber von Metoprolol reduziert wird. Es handelt sich dabei jedoch um in vitro Experimente an kardialen Endothel- und glatten Gefäßmuskelzellen. Daraus organspezifische Unterschiede abzuleiten ist sicher nicht probat, was diese Inkongruenz erklären könnte.

Da  $IL-1\beta$ , ebenso wie Angiotensin II, NF- $\kappa$ B und somit MCP 1 aktiviert, erschien uns die genauere Untersuchung des Cytokins in Bezug auf das vorliegende Experiment interessant. Im Zusammenspiel üben  $IL-1\beta$  und Angiotensin II wohl sogar einen synergistischen Effekt aus. [37] Entgegen der erwarteten Steigerung der  $IL-1\beta$  mRNA nach einem Ischämieschaden, der auch in weiteren Veröffentlichungen[33, 104] beschrieben ist, unterschied sich die Clamp-Gruppe im vorliegenden Experiment nicht signifikant von Sham. Es war vielmehr eine leichte Tendenz hin zu reduzierter Expression zu vermerken. Dies ist verwunderlich, zumal die  $IL-1\beta$ -Expression in einer von mir operierten Clamp-Gruppe (in hier vorliegender Arbeit nicht gezeigt) erhöht war. Weiter zeigte sich eine deutliche Reduktion von  $IL-1\beta$  bei Zugabe eines Betablockers nach Ischämie auf weit unter das Niveau der Kontroll-Gruppe. Hinsichtlich der Präparate Nebivolol und Metoprolol war dabei kein Unterschied feststellbar. Hinweise darauf, dass das sympathische Nervensystem über  $\beta$ -Rezeptoren inflammatorische Prozesse auslösen kann, liefern Prabhu et al.[105], indem sie im Experiment an Ratten zeigten, dass Metoprolol die Entzündungsantwort – die  $IL-1\beta$ -Expression eingeschlossen - nach Myokardinfarkt deutlich verringern kann. Genau das konnten auch Lu et al.[106] bereits 24h nach einem Infarkt ereignis nachweisen. Anhand der Tatsache, dass  $IL-1\beta$  also einerseits vom autonomen Nervensystem aktiviert wird und andererseits (zusammen mit Angiotensin II über NF- $\kappa$ B) MCP 1 steigert, wie Alique et al.[37] und andere Autoren[107] berichten, lässt sich das vielschichtige Zusammenspiel von Sympathikus und Inflammation im ANV nur erahnen. Auch andere Interleukine, TNF- $\alpha$  (Tumornekrosefaktor- $\alpha$ ) oder Interferon- $\gamma$  induzieren die MCP 1 mRNA.[99] Überdies kann die Unterdrückung der inflammatorischen Antwort, etwa durch die Inhibition von NF- $\kappa$ B oder des MCP 1 Signalweges, auch die glomeruläre iNOS-Expression

mindern und damit die Nierenfunktion (in zitierten Studien Albuminurie oder Serumharnstoff) verbessern.[35, 108]

Zusammenfassend sind also mehrere Punkte beschrieben, an denen sympathische Überaktivität entzündliche Vorgänge fördert. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass verminderte Inflammation mit besserer Nierenleistung zumindest in Korrelation steht. Dies ist in Einklang mit Ergebnissen unserer eigenen Arbeitsgruppe, nach denen eine reduzierte Makrophagenzahl in der Niere mit besserer GFR und RPF einhergeht.[90] Für eine tatsächliche Kausalität sprechen die Ergebnisse von Furuichi et al.[35], denn sie belegen, dass durch Elimination des MCP 1 Signalweges (knock-out Mäuse), die Makrophageninvasion nach Ischämie/Reperfusion gestoppt und die Nierenfunktion geschützt werden kann. Die hier beschriebenen Vorgänge, die auf Annahmen aus den zitierten Veröffentlichungen und der eigenen Arbeit beruhen, sollen in folgender Abbildung vereinfacht dargestellt werden:



*Abbildung 16: Schematische Darstellung des Zusammenspiels von sympathischer Überaktivierung, Inflammation und iNOS im ischämischen akuten Nierenversagen*

#### 4.6. Genregulation von OAT1 und OAT3 nach ANV

Der deutliche Abfall der OAT1 und OAT3 mRNA-Expression, den wir in vorliegender Arbeit verzeichnen, ist in einer Linie mit den Beobachtungen

unserer[43, 44] und denen externer[109] Arbeitsgruppen. Ein analoges Verhalten zeigt sich auch nach ANV, das durch ein Sepsismodell oder uretrale Obstruktion (postrenales ANV) ausgelöst wurde.[109, 110] Für beide Transporter konnte gezeigt werden, dass die nach Clamping beobachtete Reduktion durch die Zugabe je eines Betablockers signifikant gegenüber der Gabe von Kochsalzlösung verbessert werden konnte. Hinsichtlich der Beurteilung der PAH-Clearance ist zu bedenken, dass PAH durch glomeruläre Filtration und tubuläre Sekretion ausgeschieden wird. Der gemessene Anstieg durch die Gabe eines Betablockers könnte daher auch nur auf die stärkere Expression von OAT1/3 zurückgehen. Da jedoch zusätzlich die Inulin-Clearance und stellenweise die schädliche Entzündungsantwort verbessert wurde, spricht dies für einen (zusätzlichen) übergeordneten Effekt, der offensichtlich unter anderem die Gesamtdurchblutung verbessert. Dieser Zusammenhang wurde so bereits in einer Veröffentlichung unserer Arbeitsgruppe beschrieben.[44]

Ein möglicher Erklärungsansatz findet sich in der Beobachtung von Karim et al..[111] Sie zeigten, dass Angiotensin II über den AT1-Rezeptor die Aktivität der Proteinkinase C (PKC), die Bestandteil der G-Protein-gekoppelten Signalantwort ist, heraufregulieren kann. Solch eine Stimulation der PKC kann in der Niere den Transport organischer Anionen über OAT1/3 reduzieren.[112] Da in diesem Experiment ein Effekt schon 10 Minuten nach Stimulation der PKC zu sehen war, wurde angenommen, dass dies nicht auf veränderter Protein (und mRNA) Expression beruhte. Vielmehr konnte gezeigt werden, dass die Transporter anscheinend in die Zelle mittels Endozytose aufgenommen werden.[113] Demgegenüber steht unsere Beobachtung, dass auch die mRNA der beiden OAT im ANV reduziert ist und durch Betablocker (und somit verminderte Angiotensin II-Aktivität) verbessert werden kann. Ein entsprechender Mechanismus ist uns allerdings nicht bekannt. Gegebenenfalls ist auch eine verbesserte Organdurchblutung und somit reduzierte Ischämie für die verbesserte Genexpression verantwortlich. Der Effekt über das Niveau der Sham-behandelten Tiere hinaus ist damit jedoch nicht erklärbar.

#### 4.7. Limitationen und Ausblick

Die Beobachtungen und Ergebnisse des Experimentes, die in dieser Arbeit dargestellt und beschrieben wurden, können natürlich nur einen kleinen Teil des komplexen Geschehens des ischämischen akuten Nierenversagens miteinbeziehen. Weitgehend unbekannt sind etwa die Mechanismen, die zu einer funktionellen Verknüpfung der einzeln dargestellten pathophysiologischen Merkmale führen: Der synergistische Effekt von Angiotensin II und II-1 $\beta$  auf NF- $\kappa$ B[37], die vermehrte iNOS-Freisetzung durch MCP 1[35] oder die gesteigerte MCP 1 Genexpression durch Angiotensin II.[101] Auch der Einfluss der  $\beta$ -blockierenden oder NO-freisetzenden Substanzen Nebivolol und Metoprolol ist nur selektiv abgebildet. Um beispielsweise den Einfluss beider Pharmaka auf das RAAS detaillierter zu demonstrieren, müssten noch die Serumaktivität von Renin und Angiotensin II mitbestimmt werden. In diesem Fall haben wir die bereits in anderen Veröffentlichungen publizierten Daten[77-79] als Annahmen übernommen. Die Eigenschaft Nebivolols als NO-Donor ist ebenso lediglich durch die Aktivitäten der iNOS und eNOS wiedergegeben, da dieses als entscheidend im ANV gilt.[20] Die Messung von NO und ROS (Peroxinitrit), wie beispielsweise bei Funovic et al.[94] beschrieben, könnte weitere Einblicke in hiervon vermittelte Effekte geben. Entsprechend dem zentralen Dogma der Molekularbiologie[114, 115] wird die in den Genen als DNA gespeicherte Erbinformation über mRNA zu Proteinen transkribiert und translatiert. Die Expression der dargestellten Gene ist in vorliegender Arbeit nur im ersten Schritt durch PCR-Messungen untersucht. Mit entsprechenden Western-Blots könnte man zusätzlich noch die Protein-Ebene betrachten. Weiter könnte immunhistologisch untersucht werden, ob das durch Gabe eines Betablockers supprimierte MCP 1 sich auch tatsächlich in verringerter parenchymaler Makrophageninvasion niederschlägt. Auch hiervon kann aber, entsprechend den Ergebnissen von Rice et al.[99], ausgegangen werden.

Die Auswertung 24 Stunden nach Clamping ist einerseits sehr praktikabel, andererseits lässt sich mit diesem Intervall ein verlässlich reproduzierbares Modell des ANV etablieren. Da die Reparaturprozesse jedoch mehr als 24

Stunden in Anspruch nehmen[21], wäre es interessant, die gezeigten Veränderungen über mehrere Tage zu beobachten, beziehungsweise die Betablocker über einen längeren Zeitraum zu verabreichen. Auch Betz et al.[90] weisen in ihrer Arbeit schon darauf hin und andere Experimente demonstrieren positive Effekte durch Beeinflussung des RAAS nach 72 Stunden oder nach 7 Tagen.[79, 116]

Die in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Veränderungen der Nierendurchblutung im ANV beziehen sich auf das gesamte Organ und weisen vor allem auf die myogene Vasokonstriktion durch das RAAS hin. Da zur Minderdurchblutung jedoch auch das TGF beiträgt[19, 24], das nachweislich durch den ACE-Hemmer Enalapril ausgeschaltet werden kann[117], sollte man auch dieses in weiteren Untersuchungen im Blick behalten. Boivin et al.[66] konnten zeigen, dass sich die Verteilung der Betarezeptoren nicht nur auf die granulierten Zellen des juxtaglomerulären Apparates beschränkt, sondern auch weitere Abschnitte der Niere mit einschließt. Ein großer Teil von ihnen ist demnach apikal/intraluminal positioniert, womit Versuche mit Bisoprolol aufschlussreich sein könnten, da es zu 50% unverändert in den Urin abgegeben wird, während dieser Anteil für Metoprolol lediglich 5% und für Nebivolol sogar nur 0,5% beträgt.[29] Um Veränderungen der regionalen Blutverteilung und Mikrozirkulation im ANV und deren pharmakologische Beeinflussung in vivo zu untersuchen, ist es denkbar, dass der Einsatz bildgebender Verfahren, etwa der Magnetresonanztomographie, neue Einsichten bringen wird.

Es gibt andere Erkrankungen, die pathophysiologische Gemeinsamkeiten mit den hier beschriebenen Merkmalen des ANV haben. So konnten auch bei der Hyperurikämie experimentell eine Aktivierung des RAAS, Vasokonstriktion durch Abnahme von NO und Generierung von ROS sowie analoge inflammatorische Prozesse (MCP 1, IL-1 $\beta$ ) nachgewiesen werden.[118] Eine Inhibition der hierfür mitverantwortlichen Xanthinoxidase könnte somit denkbarerweise auch positive Auswirkungen auf den Verlauf des ischämischen ANV nehmen.

Diese Arbeit konstatiert, dass das Krankheitsbild des ANV und seine zugrunde liegenden Vorgänge noch nicht komplett verstanden sind, weswegen es auch in

Zukunft möglicherweise viele interessante Entdeckungen geben könnte. Die Forschung auf diesem Gebiet impliziert natürlich immer das Bestreben, neue therapeutische Ansätze und Wege zu etablieren.

## 5. Zusammenfassung

Es ist bekannt, dass es im akuten Nierenversagen zu einer renalen Überaktivierung des Sympathikus, des RAAS (vermittelt über  $\beta$ 1-Rezeptoren) sowie zu einem funktionellen NO-Mangel und zur Dysbalance zwischen eNOS und iNOS kommt. Diese Sachverhalte tragen zu einer Vasokonstriktion und somit verminderten Durchblutung der Nieren bei. Um hierzu weitere Erkenntnisse zu erlangen, wurde in vorliegender Arbeit der Einfluss der Betablocker Nebivolol und Metoprolol auf das akute Nierenversagen untersucht.

Zur Induktion eines ischämischen akuten Nierenversagens wurde an weiblichen Sprague Dawley® Ratten ein bilaterales Abklemmen („Clamping“) der Nierenarterien über 45 Minuten durchgeführt. Im Anschluss an die Reperfusion der Nieren wurde den Tieren dann einmalig entweder 5mg Nebivolol, 50mg Metoprolol oder Kochsalzlösung verabreicht. Zum Vergleich dienten scheinoperierte („Sham“) Tiere mit analogen Gruppen der eingesetzten Pharmaka. 24 Stunden später wurden die GFR und der RPF anhand gesammelter Blut- und Urinproben photometrisch bestimmt. Die Genexpression von iNOS/eNOS, MCP 1 und Il-1 $\beta$  sowie OAT1/3 im Nierenkortex wurde auf mRNA-Ebene mittels RT-qPCR untersucht.

Die Gabe von Nebivolol oder Metoprolol konnte den nach einer Ischämie beobachteten Abfall der GFR und des RPF signifikant abmildern. Zudem wurde die Generierung der Entzündungsmediatoren MCP 1 und Il-1 $\beta$  unterdrückt und die Expression der Transporter OAT1/3 gesteigert. In Bezug auf iNOS und eNOS konnten durch die Applikation je eines der Medikamente keine wesentlichen Veränderungen beobachtet werden. Die gemessenen Effekte waren für Nebivolol und Metoprolol nahezu identisch, so dass diese auf die  $\beta$ -blockierenden Eigenschaften der beiden Pharmaka zurückzuführen sind, ohne dass die NO-Freisetzung durch Nebivolol einen zusätzlichen Effekt zu haben scheint.

## 6. Anhang

### 6.1. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Pathophysiologie des ischämischen ANV (nach [19]) .....	8
Abbildung 2: Sekretionsmechanismus organischer Anionen ( $\text{OA}^-$ ) an der proximalen Tubuluszelle (nach [26, 41]). ATP: $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ , NaDC: $\text{Na}^+\text{-Dicarboxylat-Kotransporter}$ , MRP2: Multidrug resistance-associated protein, OAT: OAT1/3; Erklärung: siehe Text.....	12
Abbildung 3: Gefäßsystem der Niere in Beziehung zum Tubulusapparat (aus [47]), mit freundlicher Genehmigung des Elsevier Verlags.....	14
Abbildung 4: Anatomie des Glomerulums mit angrenzenden Strukturen (aus [48]), mit freundlicher Genehmigung von Springer Nature .....	15
Abbildung 5: Strukturformel von Nebivolol (aus [57]) .....	16
Abbildung 6: Strukturformel von Metoprolol (aus [60]) .....	17
Abbildung 7: Das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System .....	19
Abbildung 8: Inulin-Clearance pro 100g KG [ml/min]; in Klammern die Anzahl der Versuchstiere (n); *: statistisch signifikanter Unterschied (p-Wert <0.05) zu Sham; #: statistisch signifikanter Unterschied (p-Wert <0.05) zu Clamp .....	34
Abbildung 9: PAH-Clearance pro 100g KG [ml/min]; in Klammern die Anzahl der Versuchstiere (n); *: statistisch signifikanter Unterschied (p-Wert <0.05) zu Sham; #: statistisch signifikanter Unterschied (p-Wert <0.05) zu Clamp .....	35
Abbildung 10: iNOS mRNA-Expression bezogen auf $\beta$ -Aktin; Kontrolle = 1; in Klammern die Anzahl der Versuchstiere (n).....	37
Abbildung 11: eNOS mRNA-Expression bezogen auf $\beta$ -Aktin; Kontrolle = 1; in Klammern die Anzahl der Versuchstiere (n); *: statistisch signifikanter Unterschied (p-Wert <0.05) zu Sham .....	38
Abbildung 12: MCP 1 mRNA-Expression bezogen auf $\beta$ -Aktin; Kontrolle = 1; in Klammern die Anzahl der Versuchstiere (n); *: statistisch signifikanter Unterschied (p-Wert <0.05) zu Sham .....	39
Abbildung 13: Il-1 $\beta$ mRNA-Expression bezogen auf $\beta$ -Aktin; Kontrolle = 1; in Klammern die Anzahl der Versuchstiere (n); *: statistisch signifikanter Unterschied (p-Wert <0.05) zu Sham .....	40

Abbildung 14: OAT1 mRNA-Expression bezogen auf  $\beta$ -Aktin; Kontrolle = 1; in Klammern die Anzahl der Versuchstiere (n); \*: statistisch signifikanter Unterschied (p-Wert <0.05) zu Sham; #: statistisch signifikanter Unterschied (p-Wert <0.05) zu Clamp ..... 41

Abbildung 15: OAT3 mRNA-Expression bezogen auf  $\beta$ -Aktin; Kontrolle = 1; in Klammern die Anzahl der Versuchstiere (n); \*: statistisch signifikanter Unterschied (p-Wert <0.05) zu Sham; #: statistisch signifikanter Unterschied (p-Wert <0.05) zu Clamp ..... 42

Abbildung 16: Schematische Darstellung des Zusammenspiels von sympathischer Überaktivierung, Inflammation und iNOS im ischämischen akuten Nierenversagen ..... 53

Für Abbildung 3 wurde das Nutzungsrecht zur Verwendung in dieser Arbeit vom Elsevier Verlag schriftlich eingeholt. Vielen Dank für die freundliche Genehmigung.

Für Abbildung 4 wurde das Nutzungsrecht zur Verwendung in dieser Arbeit von Springer Nature schriftlich eingeholt. Vielen Dank für die freundliche Genehmigung.

## 6.2. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: AKIN Diagnose- und Klassifikationskriterien des ANV (nach [8]) ..... 3

Tabelle 2: Primerliste..... 32

## 6.3. Literaturverzeichnis

1. Better, O.S., *History of the crush syndrome: from the earthquakes of Messina, Sicily 1909 to Spitak, Armenia 1988*. American journal of nephrology, 1997. **17**(3-4): p. 392-394.
2. Chawla, L.S., et al., *Acute kidney injury and chronic kidney disease as interconnected syndromes*. N Engl J Med, 2014. **371**(1): p. 58-66.
3. Classen, M., et al., *Innere Medizin: 1200 Tabellen, 200 Kasuistiken, 450 Zusammenfassungen, 180 Praxisfragen*. 2009: Elsevier, Urban & Fischer.

4. Basile, D.P., M.D. Anderson, and T.A. Sutton, *Pathophysiology of acute kidney injury*. Compr Physiol, 2012. **2**(2): p. 1303-53.
5. Lameire, N.H., et al., *Acute kidney injury: an increasing global concern*. The Lancet. **382**(9887): p. 170-179.
6. Devarajan, P., *Cellular and molecular derangements in acute tubular necrosis*. Curr Opin Pediatr, 2005. **17**(2): p. 193-9.
7. Bienholz, A. and A. Kribben, *KDIGO-Leitlinien zum akuten Nierenversagen*. Der Nephrologe, 2013. **8**(3): p. 247-251.
8. Endre, Z.H., *Acute Kidney Injury: Definitions and New Paradigms*. Advances in Chronic Kidney Disease, 2008. **15**(3): p. 213-221.
9. Kellum, J., et al., *KDIGO clinical practice guideline for acute kidney injury 2012*. Kidney International Supplements, 2012. **2**: p. 1-138.
10. Bellomo, R., J.A. Kellum, and C. Ronco, *Acute kidney injury*. Lancet, 2012. **380**(9843): p. 756-66.
11. Xue, J.L., et al., *Incidence and mortality of acute renal failure in Medicare beneficiaries, 1992 to 2001*. Journal of the American Society of Nephrology, 2006. **17**(4): p. 1135-1142.
12. Liangos, O., et al., *Epidemiology and outcomes of acute renal failure in hospitalized patients: a national survey*. Clin J Am Soc Nephrol, 2006. **1**(1): p. 43-51.
13. Uchino, S., et al., *Acute renal failure in critically ill patients: a multinational, multicenter study*. Jama, 2005. **294**(7): p. 813-8.
14. Keller, C.K. and S.K. Geberth, *Praxis Der Nephrologie*. 2010: Springer.
15. Piper, W., *Innere Medizin*. 2013: Springer.
16. Jo, S.K., M.H. Rosner, and M.D. Okusa, *Pharmacologic treatment of acute kidney injury: why drugs haven't worked and what is on the horizon*. Clinical Journal of the American Society of Nephrology, 2007. **2**(2): p. 356-365.
17. Newaz, M.A. and A.O. Oyekan, *Vascular responses to endothelin-1, angiotensin-II, and U46619 in glycerol-induced acute renal failure*. J Cardiovasc Pharmacol, 2001. **38**(4): p. 569-77.
18. Husi, H. and C. Human, *Molecular determinants of acute kidney injury*. J Inj Violence Res, 2015. **7**(2): p. 75-86.
19. Bonventre, J.V. and J.M. Weinberg, *Recent advances in the pathophysiology of ischemic acute renal failure*. J Am Soc Nephrol, 2003. **14**(8): p. 2199-210.
20. Goligorsky, M.S., S.V. Brodsky, and E. Noiri, *NO bioavailability, endothelial dysfunction, and acute renal failure: new insights into pathophysiology*. Semin Nephrol, 2004. **24**(4): p. 316-23.
21. Schneider, R., et al., *L-Arginine counteracts nitric oxide deficiency and improves the recovery phase of ischemic acute renal failure in rats*. Kidney Int, 2003. **64**(1): p. 216-25.
22. Schrier, R.W., et al., *Acute renal failure: definitions, diagnosis, pathogenesis, and therapy*. The Journal of Clinical Investigation, 2004. **114**(1): p. 5-14.
23. Goligorsky, M.S., S.V. Brodsky, and E. Noiri, *Nitric oxide in acute renal failure: NOS versus NOS*. Kidney Int, 2002. **61**(3): p. 855-61.

24. Okusa, M.D., *A(2A) adenosine receptor: a novel therapeutic target in renal disease*. Am J Physiol Renal Physiol, 2002. **282**(1): p. F10-8.
25. Klinke, R., C. Bauer, and S. Silbernagl, *Lehrbuch der Physiologie*. 2003: Thieme.
26. Gekle, M., et al., *Taschenlehrbuch Physiologie*. 2010: Thieme.
27. Zafrani, L. and C. Ince, *Microcirculation in Acute and Chronic Kidney Diseases*. Am J Kidney Dis, 2015. **66**(6): p. 1083-94.
28. Dong, Z., et al., *Development of porous defects in plasma membranes of adenosine triphosphate-depleted Madin-Darby canine kidney cells and its inhibition by glycine*. Lab Invest, 1998. **78**(6): p. 657-68.
29. Aktories, K., *Pharmakologie und Toxikologie*. 2009: Elsevier, Urban & Fischer.
30. Ling, H., et al., *Effect of hypoxia on proximal tubules isolated from nitric oxide synthase knockout mice*. Kidney Int, 1998. **53**(6): p. 1642-6.
31. Basile, D.P., *The endothelial cell in ischemic acute kidney injury: implications for acute and chronic function*. Kidney Int, 2007. **72**(2): p. 151-156.
32. Lee, D.W., S. Faubel, and C.L. Edelstein, *Cytokines in acute kidney injury (AKI)*. Clin Nephrol, 2011. **76**(3): p. 165-73.
33. Bonventre, J.V. and A. Zuk, *Ischemic acute renal failure: an inflammatory disease?* Kidney Int, 2004. **66**(2): p. 480-5.
34. Zager, R.A., et al., *Acute renal failure: determinants and characteristics of the injury-induced hyperinflammatory response*. Am J Physiol Renal Physiol, 2006. **291**(3): p. F546-56.
35. Furuichi, K., et al., *CCR2 signaling contributes to ischemia-reperfusion injury in kidney*. J Am Soc Nephrol, 2003. **14**(10): p. 2503-15.
36. Kirby, N.A., et al., *Urinary MCP1 and Microalbumin increase prior to onset of Azotemia in mice with polycystic kidney disease*. Comp Med, 2014. **64**(2): p. 99-105.
37. Alique, M., et al., *Angiotensin II, via angiotensin receptor type 1/nuclear factor-kappaB activation, causes a synergistic effect on interleukin-1-beta-induced inflammatory responses in cultured mesangial cells*. J Renin Angiotensin Aldosterone Syst, 2015. **16**(1): p. 23-32.
38. Jung, J.S., et al., *Changes in expression of sodium cotransporters and aquaporin-2 during ischemia-reperfusion injury in rabbit kidney*. Ren Fail, 2000. **22**(4): p. 407-21.
39. Enomoto, A. and H. Endou, *Roles of organic anion transporters (OATs) and a urate transporter (URAT1) in the pathophysiology of human disease*. Clin Exp Nephrol, 2005. **9**(3): p. 195-205.
40. Runembert, I., et al., *Recovery of Na-glucose cotransport activity after renal ischemia is impaired in mice lacking vimentin*. Am J Physiol Renal Physiol, 2004. **287**(5): p. F960-8.
41. Sweet, D.H., et al., *Organic anion transporter 3 (Slc22a8) is a dicarboxylate exchanger indirectly coupled to the Na<sup>+</sup> gradient*. Am J Physiol Renal Physiol, 2003. **284**(4): p. F763-9.
42. Dantzler, W.H. and S.H. Wright, *The molecular and cellular physiology of basolateral organic anion transport in mammalian renal tubules*. Biochim Biophys Acta, 2003. **1618**(2): p. 185-93.

43. Schneider, R., et al., *Downregulation of organic anion transporters OAT1 and OAT3 correlates with impaired secretion of para-aminohippurate after ischemic acute renal failure in rats*. Am J Physiol Renal Physiol, 2007. **292**(5): p. F1599-605.
44. Schneider, R., et al., *Low-dose indomethacin after ischemic acute kidney injury prevents downregulation of Oat1/3 and improves renal outcome*. Am J Physiol Renal Physiol, 2009. **297**(6): p. F1614-21.
45. Schmidt, R.F., F. Lang, and M. Heckmann, *Physiologie des Menschen: mit Pathophysiologie*. 2011: Springer Berlin Heidelberg.
46. Drenckhahn, D., *Anatomie: Zellen- und Gewebelehre, Entwicklungslehre, Skelett- und Muskelsystem, Atemsystem, Verdauungssystem, Harn- und Genitalsystem*. 2008: Elsevier, Urban & Fischer.
47. Paulsen, Waschke, *Sobotta Atlas der Anatomie des Menschen, 23. Auflage 2010*. © Elsevier GmbH, Urban & Fischer, München.
48. Zilles, K. and B. Tillmann, *Anatomie*. 2010: Springer Berlin Heidelberg.
49. Yoldas, A. and M.O. Dayan, *Morphological characteristics of renal artery and kidney in rats*. ScientificWorldJournal, 2014. **2014**: p. 468982.
50. Reece, J.B., et al., *Biologie*. 2015: Pearson.
51. Okamoto, L.E., et al., *Nebivolol, but not metoprolol, lowers blood pressure in nitric oxide-sensitive human hypertension*. Hypertension, 2014. **64**(6): p. 1241-7.
52. Fongemie, J. and E. Felix-Getzik, *A Review of Nebivolol Pharmacology and Clinical Evidence*. Drugs, 2015. **75**(12): p. 1349-1371.
53. Gschwend, S., et al., *Short-term treatment with a beta-blocker with vasodilative capacities improves intrarenal endothelial function in experimental renal failure*. Life Sci, 2009. **85**(11-12): p. 431-7.
54. Ladage, D., et al., *Mechanisms underlying nebivolol-induced endothelial nitric oxide synthase activation in human umbilical vein endothelial cells*. Clin Exp Pharmacol Physiol, 2006. **33**(8): p. 720-4.
55. Broeders, M.A., et al., *Nebivolol: a third-generation beta-blocker that augments vascular nitric oxide release: endothelial beta(2)-adrenergic receptor-mediated nitric oxide production*. Circulation, 2000. **102**(6): p. 677-84.
56. Kalinowski, L., et al., *Third-generation beta-blockers stimulate nitric oxide release from endothelial cells through ATP efflux: a novel mechanism for antihypertensive action*. Circulation, 2003. **107**(21): p. 2747-52.
57. Fvasconcellos. *Nebivolol.svg*. 2006 [cited 2018 22.3.2018]; Available from:  
<https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/2/2d/Nebivolol.svg>.
58. Prisant, L.M., *Nebivolol: pharmacologic profile of an ultraselective, vasodilatory beta1-blocker*. J Clin Pharmacol, 2008. **48**(2): p. 225-39.
59. Regardh, C.G. and G. Johnsson, *Clinical pharmacokinetics of metoprolol*. Clin Pharmacokinet, 1980. **5**(6): p. 557-69.
60. Yikrazuul. *Metoprolol structure.svg*. 2008 [cited 2018 22.3.2018]; Available from:  
[https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/c/c9/Metoprolol\\_structure.svg](https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/c/c9/Metoprolol_structure.svg).

61. Johns, E.J., *The neural regulation of the kidney in hypertension and renal failure*. Exp Physiol, 2014. **99**(2): p. 289-94.
62. DiBona, G.F., *Physiology in perspective: The Wisdom of the Body. Neural control of the kidney*. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2005. **289**(3): p. R633-41.
63. Pelayo, J.C., B.J. Tucker, and R.C. Blantz, *Effects of beta-adrenergic stimulation with isoproterenol on glomerular hemodynamics*. Am J Physiol, 1989. **257**(5 Pt 2): p. F866-73.
64. Mutschler, E., *Mutschler Arzneimittelwirkungen*. 2013: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft Stuttgart.
65. Kim, S.J., et al., *Mechanism of reduced GFR in rabbits with ischemic acute renal failure*. Renal failure, 2000. **22**(2): p. 129-141.
66. Boivin, V., et al., *Immunofluorescent imaging of beta 1- and beta 2-adrenergic receptors in rat kidney*. Kidney Int, 2001. **59**(2): p. 515-31.
67. Linz, D., et al., *Progression of kidney injury and cardiac remodeling in obese spontaneously hypertensive rats: the role of renal sympathetic innervation*. Am J Hypertens, 2015. **28**(2): p. 256-65.
68. DiBona, G.F., *Neural control of renal function in health and disease*. Clinical Autonomic Research, 1994. **4**(1): p. 69-74.
69. Garcia-Criado, F.J., et al., *Protective effect of exogenous nitric oxide on the renal function and inflammatory response in a model of ischemia-reperfusion*. Transplantation, 1998. **66**(8): p. 982-90.
70. Fleck, C., *Determination of the glomerular filtration rate (GFR): methodological problems, age-dependence, consequences of various surgical interventions, and the influence of different drugs and toxic substances*. Physiol Res, 1999. **48**(4): p. 267-79.
71. Heyman, S.N., C. Rosenberger, and S. Rosen, *Experimental ischemia-reperfusion: biases and myths—the proximal vs. distal hypoxic tubular injury debate revisited*. Kidney international, 2009. **77**(1): p. 9-16.
72. Heyman, S.N., C. Rosenberger, and S. Rosen, *Acute kidney injury: lessons from experimental models*. 2011.
73. Heyman, S.N., S. Rosen, and C. Rosenberger, *Animal models of renal dysfunction: acute kidney injury*. Expert Opin Drug Discov, 2009. **4**(6): p. 629-41.
74. Muller, V., et al., *Sexual dimorphism in renal ischemia-reperfusion injury in rats: possible role of endothelin*. Kidney Int, 2002. **62**(4): p. 1364-71.
75. Himmelfarb, J., et al., *Impaired monocyte cytokine production in critically ill patients with acute renal failure*. Kidney Int, 2004. **66**(6): p. 2354-60.
76. Freissmuth, M., S. Offermanns, and S. Böhm, *Pharmakologie und Toxikologie: Von den molekularen Grundlagen zur Pharmakotherapie*. 2012: Springer.
77. Kokot, F. and J. Kuska, *Plasma renin activity in acute renal insufficiency*. Nephron, 1969. **6**(2): p. 115-27.
78. Mitch, W.E. and W.G. Walker, *Plasma renin and angiotensin II in acute renal failure*. Lancet, 1977. **2**(8033): p. 328-30.
79. Kontogiannis, J. and K.D. Burns, *Role of AT1 angiotensin II receptors in renal ischemic injury*. Am J Physiol, 1998. **274**(1 Pt 2): p. F79-90.

80. Moniwa, N., et al., *Primacy of angiotensin converting enzyme in angiotensin-(1-12) metabolism*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2013. **305**(5): p. H644-50.
81. Ferrario, C.M., *New physiological concepts of the renin-angiotensin system from the investigation of precursors and products of angiotensin I metabolism*. Hypertension, 2010. **55**(2): p. 445-52.
82. Lorenz, J.N., *Chymase: the other ACE?* Am J Physiol Renal Physiol, 2010. **298**(1): p. F35-6.
83. Iaina, A., S. Solomon, and H.E. Eliahou, *Reduction in severity of acute renal failure in rats by beta-adrenergic blockade*. Lancet, 1975. **2**(7926): p. 157-9.
84. El-Gowilly, S.M., *Metoprolol ameliorates cyclosporine a-induced hypertension and nephrotoxicity in rats*. J Cardiovasc Pharmacol, 2011. **58**(6): p. 639-46.
85. Gandhi, C., R. Zalawadia, and R. Balaraman, *Nebivolol reduces experimentally induced warm renal ischemia reperfusion injury in rats*. Ren Fail, 2008. **30**(9): p. 921-30.
86. Noiri, E., et al., *In vivo targeting of inducible NO synthase with oligodeoxynucleotides protects rat kidney against ischemia*. J Clin Invest, 1996. **97**(10): p. 2377-83.
87. Chiao, H., et al., *Alpha-melanocyte-stimulating hormone protects against renal injury after ischemia in mice and rats*. J Clin Invest, 1997. **99**(6): p. 1165-72.
88. Chen, H., et al., *Ozone oxidative preconditioning protects the rat kidney from reperfusion injury: the role of nitric oxide*. J Surg Res, 2008. **149**(2): p. 287-95.
89. Komurai, M., et al., *Role of nitric oxide synthase activity in experimental ischemic acute renal failure in rats*. Mol Cell Biochem, 2003. **244**(1-2): p. 129-33.
90. Betz, B., et al., *Rosiglitazone affects nitric oxide synthases and improves renal outcome in a rat model of severe ischemia/reperfusion injury*. PPAR Res, 2012. **2012**: p. 219319.
91. Sartori, C., M. Lepori, and U. Scherrer, *Interaction between nitric oxide and the cholinergic and sympathetic nervous system in cardiovascular control in humans*. Pharmacol Ther, 2005. **106**(2): p. 209-20.
92. Ito, S., C.S. Johnson, and O.A. Carretero, *Modulation of angiotensin II-induced vasoconstriction by endothelium-derived relaxing factor in the isolated microperfused rabbit afferent arteriole*. J Clin Invest, 1991. **87**(5): p. 1656-63.
93. Sharifi, A.M., N. Akbarloo, and R. Darabi, *Investigation of local ACE activity and structural alterations during development of L-NAME-induced hypertension*. Pharmacol Res, 2005. **52**(5): p. 438-44.
94. Funovic, P., et al., *Effect of beta-blockers on endothelial function during biological aging: a nanotechnological approach*. J Cardiovasc Pharmacol, 2008. **51**(2): p. 208-15.
95. Mason, R.P., et al., *Loss of arterial and renal nitric oxide bioavailability in hypertensive rats with diabetes: effect of beta-blockers*. Am J Hypertens, 2009. **22**(11): p. 1160-6.

96. Sullivan, J.C. and J.S. Pollock, *Coupled and uncoupled NOS: separate but equal? Uncoupled NOS in endothelial cells is a critical pathway for intracellular signaling*. *Circ Res*, 2006. **98**(6): p. 717-9.
97. Kinsey, G.R., L. Li, and M.D. Okusa, *Inflammation in acute kidney injury*. *Nephron Exp Nephrol*, 2008. **109**(4): p. e102-7.
98. Rovin, B.H. and L.T. Phan, *Chemotactic factors and renal inflammation*. *Am J Kidney Dis*, 1998. **31**(6): p. 1065-84.
99. Rice, J.C., et al., *Monocyte chemoattractant protein-1 expression correlates with monocyte infiltration in the post-ischemic kidney*. *Ren Fail*, 2002. **24**(6): p. 703-23.
100. Safirstein, R., et al., *Expression of cytokine-like genes JE and KC is increased during renal ischemia*. *Am J Physiol*, 1991. **261**(6 Pt 2): p. F1095-101.
101. Ruiz-Ortega, M., et al., *Angiotensin II participates in mononuclear cell recruitment in experimental immune complex nephritis through nuclear factor-kappa B activation and monocyte chemoattractant protein-1 synthesis*. *J Immunol*, 1998. **161**(1): p. 430-9.
102. Wolf, S.C., et al., *Influence of nebivolol and metoprolol on inflammatory mediators in human coronary endothelial or smooth muscle cells. Effects on neointima formation after balloon denudation in carotid arteries of rats treated with nebivolol*. *Cell Physiol Biochem*, 2007. **19**(1-4): p. 129-36.
103. Wolf, S.C., et al., *Major differences in gene expression in human coronary smooth muscle cells after nebivolol or metoprolol treatment*. *Int J Cardiol*, 2008. **125**(1): p. 4-10.
104. Zhang, J., et al., *Erythropoietin pretreatment ameliorates renal ischaemia-reperfusion injury by activating PI3K/Akt signalling*. *Nephrology (Carlton)*, 2015. **20**(4): p. 266-72.
105. Prabhu, S.D., et al., *beta-adrenergic blockade in developing heart failure: effects on myocardial inflammatory cytokines, nitric oxide, and remodeling*. *Circulation*, 2000. **101**(17): p. 2103-9.
106. Lu, Y., et al., *Beta blocker metoprolol protects against contractile dysfunction in rats after coronary microembolization by regulating expression of myocardial inflammatory cytokines*. *Life Sci*, 2011. **88**(23-24): p. 1009-15.
107. Schmodder, R.L., R.M. Strieter, and S.L. Kunkel, *Interferon-gamma regulation of human renal cortical epithelial cell-derived monocyte chemotactic peptide-1*. *Kidney Int*, 1993. **44**(1): p. 43-9.
108. Muller, D.N., et al., *NF-kappaB inhibition ameliorates angiotensin II-induced inflammatory damage in rats*. *Hypertension*, 2000. **35**(1 Pt 2): p. 193-201.
109. Hocherl, K., C. Schmidt, and M. Bucher, *COX-2 inhibition attenuates endotoxin-induced downregulation of organic anion transporters in the rat renal cortex*. *Kidney Int*, 2009. **75**(4): p. 373-80.
110. Villar, S.R., et al., *Altered expression of rat renal cortical OAT1 and OAT3 in response to bilateral ureteral obstruction*. *Kidney Int*, 2005. **68**(6): p. 2704-13.

111. Karim, Z., et al., *Protein kinase C isoforms in rat kidney proximal tubule: acute effect of angiotensin II*. Am J Physiol, 1995. **269**(1 Pt 1): p. C134-40.
112. Takeda, M., T. Sekine, and H. Endou, *Regulation by protein kinase C of organic anion transport driven by rat organic anion transporter 3 (rOAT3)*. Life Sci, 2000. **67**(9): p. 1087-93.
113. Wolff, N.A., et al., *Protein kinase C activation downregulates human organic anion transporter 1-mediated transport through carrier internalization*. J Am Soc Nephrol, 2003. **14**(8): p. 1959-68.
114. Crick, F., *Central dogma of molecular biology*. Nature, 1970. **227**(5258): p. 561-3.
115. Crick, F.H., *On protein synthesis*. Symp Soc Exp Biol, 1958. **12**: p. 138-63.
116. Heller, J., et al., *Losartan protects the rat kidney from ischemic injury*. Kidney Int Suppl, 1996. **55**: p. S113-4.
117. Koelz, A.M., et al., *The angiotensin converting enzyme inhibitor enalapril in acute ischemic renal failure in rats*. Experientia, 1988. **44**(2): p. 172-5.
118. Reuss-Borst, M.A., *Hyperuricemia*. Der Internist, 2016. **57**(2): p. 194-201.

## Danksagung

Ich möchte mich am Ende dieser Arbeit recht herzlich bei allen bedanken, die zu ihrer erfolgreichen Fertigstellung beigetragen haben.

Hierbei ist zunächst Herr Prof. Dr. med. Christoph Wanner zu nennen, der mir die Möglichkeit gab, die Arbeit in seiner Abteilung durchzuführen.

Herrn Priv.-Doz. Dr. med. Reinhard Schneider danke ich für die Bereitstellung des Themas und die durchgehend engagierte, kompetente und freundliche Betreuung.

Den Mitarbeiterinnen des nephrologischen Labors, Frau Dr. Kerstin Möller-Ehrlich, Frau Margarete Röder, Frau Sylvia Renker und Frau Carmen Bauer gilt besonderer Dank für ihre Bemühungen bei technisch-praktischen Fragen und die gute Atmosphäre bei der Arbeit.

Der Leitung sowie den Mitarbeitern des ZEMM möchte ich ein Lob für die tadellose Unterbringung der Versuchstiere aussprechen.

Meiner Familie und meinen Freunden danke ich für ihre bedingungslose Unterstützung während des Studiums und darüber hinaus; meinen Eltern hierbei insbesondere dafür, dass sie mir das Studium ermöglichten.

Nicht zuletzt bin ich all jenen dankbar, die mir die Medizin näher gebracht haben und mich während meiner Ausbildung sowie meiner bisherigen ärztlichen Tätigkeit immer wieder aufs Neue dafür begeistern können!

Lebenslauf

*Der Lebenslauf ist aus Gründen des persönlichen Datenschutzes in der elektronischen Fassung nicht enthalten.*