

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

Direktor: Professor Dr. med. G. Ertl

**Funktionelle Effekte auf das CO- und NO-System
im ischämischen akuten Nierenversagen unter dem Einfluss von Zinn-Mesoporphyrin**

Inaugural - Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der

Medizinischen Fakultät

der

Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Diana Fischer

aus Nürnberg

Würzburg, Oktober 2007

Referent: Prof. Dr. med. Christoph Wanner

Koreferent: Priv.-Doz. Dr. rer. Nat. Christoph Sauvant

Dekan: Prof. Dr. M. Frosch

Tag der mündlichen Prüfung : 20.02.2009

Die Promovendin ist Ärztin

Meinen Eltern gewidmet
In Dankbarkeit für ihre Unterstützung

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Das akute Nierenversagen	1
1.2	Die Rolle des Häm-Hämoxigenase-Kohlenmonoxid-Systems im ANV	5
1.2.1	Die induzierbare Hämoxigenase – HO-1	7
1.2.2	Kohlenmonoxid	8
1.2.3	Biliverdin und Bilirubin	9
1.2.4	Biliverdinreduktase	10
1.2.5	Eisen	11
1.3	Die Modulation der Hämoxigenasen durch SnMP	11
1.4	Die Rolle von Stickstoffmonoxid in der Niere	12
1.4.1	Die Stickoxidsynthese	14
1.4.2	Die lösliche Guanylatzyklase	16
1.5	Arbeitshypothese	17
2	Material und Methoden	18
2.1	Probengewinnung	18
2.1.1	Versuchstiere und Tierhaltung	18
2.1.2	Einteilung der Versuchsgruppen	18
2.1.3	Operation und Probenentnahme	19
2.2	Inulinmessung	21
2.3	Immunhistochemische Proteinbestimmung	22
2.3.1	Probenvorbereitung	22
2.3.2	Auftrennung der Proteine in der SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese nach Lämmli	23
2.3.3	Westernblot	24
2.3.4	Immunchemischer Antigen-Nachweis	24
2.3.4.1	Verfahren	24
2.3.4.2	Antikörper und Positivkontrollen	26
2.3.4.3	Chemolumineszenz	27
2.4	Software und Statistik	27
2.5	Geräte und Chemikalien	28
2.5.1	Geräte	28
2.5.2	Chemikalien	28

3	Ergebnisse	29
3.1	Verlauf der funktionellen Parameter im ANV	29
3.2	Die Auswirkungen von SnMP auf die Expression der Hämoxygenase-1 im akuten ischämischen Nierenversagen	33
3.2.1	Expression der Hämoxygenase-1 im Kortex	33
3.2.2	Expression der Hämoxygenase-1 in der Medulla	35
3.3	Die Auswirkungen von SnMP auf die Expression der Hämoxygenase-2 im akuten ischämischen Nierenversagen	37
3.3.1	Expression der Hämoxygenase-2 im Kortex	37
3.3.2	Expression der Hämoxygenase-2 in der Medulla	39
3.4	Die Auswirkungen von SnMP auf die Expression der endothelialen Stickoxidsynthase im akuten ischämischen Nierenversagen	41
3.4.1	Expression der endothelialen Stickoxidsynthase im Kortex	41
3.4.2	Expression der endothelialen Stickoxidsynthase in der Medulla	43
3.5	Die Auswirkungen von SnMP auf die Expression der löslichen Guanylatzyklase im akuten ischämischen Nierenversagen	45
3.5.1	Expression der löslichen Guanylatzyklase im Kortex	45
3.5.2	Expression der löslichen Guanylatzyklase in der Medulla	47
3.6	Die Auswirkungen von SnMP auf die Expression der Biliverdinreduktase im akuten ischämischen Nierenversagen	49
3.6.1	Expression der Biliverdinreduktase im Kortex	49
3.6.2	Expression der Biliverdinreduktase in der Medulla	51
3.7	Zusammenfassung der Ergebnisse	53
4	Diskussion	54
4.1	Methodik und Auswertung	55
4.2	Die Funktionsparameter	56
4.3	Die Expressionswerte	59
4.3.1	Hämoxygenase-1 und Hämoxygenase-2	59
4.3.2	Endotheliale Stickoxidsynthase und lösliche Guanylatzyklase	61
4.3.3	Biliverdinreduktase	63
4.4	Validität des Versuchsmodells für das ANV beim Menschen	64
5	Zusammenfassung	66
	Literaturverzeichnis	67
	Danksagung	78
	Lebenslauf	79

Verzeichnis der Abbildungen und Tabellen

Abb. 1	Pathophysiologie des akuten ischämischen Nierenversagens	3
Abb. 2	Hämabbau durch die Hämoxygenase und die Biliverdinreduktase	6
Abb. 3	Inulin-Clearance der Clamping- (graue Linie/Quadrat) und der Clamping + SnMP-Gruppe (schwarze Linie/Dreieck) im postinterventionellen Verlauf von 14 Tagen nach akuten ischämischen Nierenversagen (jeweils n = 5-9, * = p < 0,05)	31
Abb. 4	PAH-Clearance der Clamping- (graue Linie/Quadrat) und der Clamping + SnMP-Gruppe (schwarze Linie/Dreieck) im postinterventionellen Verlauf von 14 Tagen nach akuten ischämischen Nierenversagen (jeweils n = 5-9, * = p < 0,05)	32
Abb. 5	Repräsentative Westernblot-Analyse der postinterventionellen HO1-Expression in der Nierenrinde für die Gruppen Clamping („C“), Clamping + SnMP („C-SnMP“) und Sham an den Tagen 1, 3, 7 und 14.	34
Abb. 6	Enzymexpression der HO1 im renalen Kortex nach akutem ischämischen Nierenversagen. Vergleich von Clamping- (grau), Clamping + SnMP- (schraffiert) und Sham-Gruppe (weiss), jeweils n = 4-6 (* = p < 0,05).	34
Abb. 7	Repräsentative Westernblot-Analyse der postinterventionellen HO1-Expression im Nierenmark für die Gruppen Clamping („C“), Clamping + SnMP („C-SnMP“) und Sham an den Tagen 1, 3, 7 und 14.	36
Abb. 8	Enzymexpression der HO1 in der renalen Medulla nach akuten ischämischen Nierenversagen. Vergleich von Clamping- (grau), Clamping + SnMP- (schraffiert) und Sham-Gruppe (weiss), jeweils n = 4-6 (* = p < 0,05).	36
Abb. 9	Repräsentative Westernblot-Analyse der postinterventionellen HO2-Expression in der Nierenrinde für die Gruppen Clamping („C“), Clamping + SnMP („C-SnMP“) und Sham an den Tagen 1, 3, 7 und 14.	38
Abb. 10	Enzymexpression der HO2 im renalen Kortex nach akuten ischämischen Nierenversagen. Vergleich von Clamping- (grau), Clamping + SnMP- (schraffiert) und Sham-Gruppe (weiss), jeweils n = 4-6 (* = p < 0,05).	38
Abb. 11	Repräsentative Westernblot-Analyse der postinterventionellen HO2-Expression im Nierenmark für die Gruppen Clamping („C“), Clamping + SnMP („C-SnMP“) und Sham an den Tagen 1, 3, 7 und 14.	40

Abb. 12	Enzymexpression der HO2 in der renalen Medulla nach akuten ischämischen Nierenversagen. Vergleich von Clamping- (grau), Clamping + SnMP- (schraffiert) und Sham-Gruppe (weiss), jeweils n = 4-6 (* = p < 0,05).	40
Abb. 13	Repräsentative Westernblot-Analyse der postinterventionellen eNOS-Expression in der Nierenrinde für die Gruppen Clamping („C“), Clamping + SnMP („C-SnMP“) und Sham an den Tagen 1, 3, 7 und 14.	42
Abb. 14	Enzymexpression der eNOS im renalen Kortex nach akuten ischämischen Nierenversagen. Vergleich von Clamping- (grau), Clamping + SnMP- (schraffiert) und Sham-Gruppe (weiss), jeweils n = 4-6 (* = p < 0,05).	42
Abb. 15	Repräsentative Westernblot-Analyse der postinterventionellen eNOS-Expression im Nierenmark für die Gruppen Clamping („C“), Clamping + SnMP („C-SnMP“) und Sham an den Tagen 1, 3, 7 und 14.	44
Abb. 16	Enzymexpression der eNOS in der renalen Medulla nach akuten ischämischen Nierenversagen. Vergleich von Clamping- (grau), Clamping + SnMP- (schraffiert) und Sham-Gruppe (weiss), jeweils n = 4-6 (* = p < 0,05).	44
Abb. 17	Repräsentative Westernblot-Analyse der postinterventionellen sGC-β-Expression in der Nierenrinde für die Gruppen Clamping („C“), Clamping + SnMP („C-SnMP“) und Sham an den Tagen 1, 3, 7 und 14.	46
Abb. 18	Enzymexpression der sGC-β im renalen Kortex nach akuten ischämischen Nierenversagen. Vergleich von Clamping- (grau), Clamping + SnMP- (schraffiert) und Sham-Gruppe (weiss), jeweils n = 4-6 (* = p < 0,05).	46
Abb. 19	Repräsentative Westernblot-Analyse der postinterventionellen sGC-β-Expression im Nierenmark für die Gruppen Clamping („C“), Clamping + SnMP („C-SnMP“) und Sham an den Tagen 1, 3, 7 und 14.	48
Abb. 20	Enzymexpression der sGC-β in der renalen Medulla nach akuten ischämischen Nierenversagen. Vergleich von Clamping- (grau), Clamping + SnMP- (schraffiert) und Sham-Gruppe (weiss), jeweils n = 4-6 (* = p < 0,05).	48
Abb. 21	Repräsentative Westernblot-Analyse der postinterventionellen BVR - Expression in der Nierenrinde für die Gruppen Clamping („C“), Clamping + SnMP („C-SnMP“) und Sham an den Tagen 1, 3, 7 und 14.	50
Abb. 22	Enzymexpression der BVR im renalen Kortex nach akuten ischämischen Nierenversagen. Vergleich von Clamping- (grau), Clamping + SnMP- (schraffiert) und Sham-Gruppe (weiss), jeweils n = 4-6 (* = p < 0,05).	50

Abb. 23	Repräsentative Westernblot-Analyse der postinterventionellen BVR-Expression im Nierenmark für die Gruppen Clamping („C“), Clamping + SnMP („C-SnMP“) und Sham an den Tagen 1, 3, 7 und 14.	52
Abb. 24	Enzymexpression der BVR in der renalen Medulla nach akuten ischämischen Nierenversagen. Vergleich von Clamping- (grau), Clamping + SnMP- (schraffiert) und Sham-Gruppe (weiss), jeweils n = 4-6 (* = p < 0,05).	52
Tab. 1	Antikörper-Konzentrationen	25
Tab. 2	Antikörper und Kontrollproteine	26
Tab. 3	Geräteliste	28

Abkürzungen

ANV	Akutes Nierenversagen
ATF6	„activating transkription factor 6“
ATN	Akute tubuläre Nekrose
ATP	Adenosin-Triphosphat
BH ₄	Tetrahydrobiopterin
BVR	Biliverdinreduktase
CO	Kohlenmonoxid
CORM	CO-releasing molecule
CYP450	Cytochrom P450
EDCF	„Endothelium-derived constricting factor“
EDRF	„endothelium-derived relaxing factor“
ET-1	Endothelin
ET-1	Endothelin-1
FAD	Flavin-Adenin-Dinukleotid
FMN	Flavin-Adenin-Mononukleotid
GFR	Glomeruläre Filtrationsfraktion
GMP	Guaninmonophosphat
cGMP	Zyklisches Guanosinmonophosphat
Grp 78	Glukose-reguliertes Protein 78
GTP	Guanosintriphosphat
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HETE-20	20-Hydroxyeicosatetraensäure
HIF	Hypoxie-induzierter Faktor
HO	Hämoxygenase
HSP32	„Heat-shock“-Protein 32
IRF-1	„Iron-regulating factor“-1
ICAM-1	interzelluläres Adhäsionsmolekül-1
L-Nil	L-N ⁶ -(1-Iminoethyl)-Lysin
LPS	Lipopolysaccharid
MAPK	„mitogen-activated protein kinase“

NADH/NADPH	Nikotinamidadenindinukleotid/ -phosphat
NO	Stickstoffmonoxid
NOS	Stickoxidsynthase
eNOS	Endotheliale Stickoxidsynthase
iNOS	Induzierbare Stickoxidsynthase
nNOS	Neuronale Stickoxidsynthase
O ₂ ⁻	Hyperoxid
ONOO ⁻	Peroxynitrit
PDE	Phosphodiesterase
PKG	Proteinkinase G
RBF	Renaler Plasmafluss
sGC	Lösliche Guanylylzyklase
SnCl ₂	„Stannous“ Chlorid = Zinn-Chlorid
SnPP	„Stannous“ Protoporphyrin
SnMP	„Stannous“ Mesoporphyrin = Zinn(VI)-Mesoporphyrin
TNF-alpha	Tumornekrosefaktor-alpha

1 Einleitung

1.1 Das akute Nierenversagen

Das akute Nierenversagen (ANV) ist definiert als ein rascher, sich über Stunden bis Tage entwickelnder, partieller oder totaler Ausfall der Nierenfunktion, der prinzipiell reversibel ist. Messbar an der glomerulären Filtrationsfraktion (GFR) kommt es zum Versiegen der Urinausscheidung im Sinne einer Oligo- (<500 ml Urin/die) oder Anurie (<200 ml Urin/die). Selten, in ca. 15% der Fälle, zeigt sich ein atypischer Verlauf mit einer bereits primär normo- oder polyurischen Entwicklung des ANVs.

Zusätzlich kommt es zur Einschränkung weiterer Funktionen der Niere, nämlich der Elimination von Endprodukten des Stoffwechsels und Fremdstoffen, wie Harnstoff und Harnsäure, bzw. Medikamenten und Toxinen, und der Rückresorption filtrierter Substanzen. Ebenfalls betroffen sind die Regulation des Elektrolyt- und des Säuren-Basen-Haushaltes, sowie die endokrinen Funktionen der Niere im Sinne der Bildung von Erythropoetin, Calcitriol, Angiotensin II und Renin.

Klinisch zeigt das ANV einen typisch phasenhaften Verlauf. Die Stunden bis Tage andauernde Initialphase beschreibt das Ereignis der Schädigung bei noch normaler Nierenfunktion. In der folgenden oligo-, bzw. anurischen Phase kommt es zum Sistieren der Urinausscheidung und Ansteigen der Retentionswerte im Serum. Zeichen der Wasserretention wie arterielle Hypertonie, periphere Ödembildung, Lungenödem, aber auch Elektrolytstörungen mit Hyperkaliämie und metabolischer Azidose charakterisieren diesen Abschnitt. Urämische Symptome, wie Nausea, Erbrechen, Verwirrheitszustände, bis hin zum urämischem Koma treten allerdings in der Regel nur bei einem schweren und prolongierten Verlauf des ANVs auf. Diese oligo-/anurische Phase kann Tage bis wenige Wochen dauern, bis sie in die Erholungsphase übergeht, für welche eine Polyurie von mehr als 4 l/die typisch ist, da die tubuläre Resorptionsfähigkeit noch eingeschränkt ist, während die Filtrationsfunktion wieder partiell oder bereits vollständig einsetzt. In Rahmen der Regenerationsphase normalisieren sich Urinvolumen und Nierenfunktion, was Wochen bis in seltenen Fällen auch Monate dauern kann.

Die Ursachen für ein ANV können in drei Kategorien eingeteilt werden. Bei der prärenalen Form kommt es zu den oben beschriebenen Veränderungen, hervorgerufen durch eine verminderte renale Perfusion und damit einem Absinken der GFR. Dies kann ausgelöst werden durch Hypovolämie, Hypotonie und Dehydratation infolge von Blutverlusten, Hämolyse oder Wasser- und Elektrolytverlusten, außerdem im Rahmen eines Schocks oder einer schweren Infektion. Das postrenale ANV wird durch eine Harnabflussbehinderung verursacht, beispielsweise einer Obstruktion des Harnleitersystems durch Steine, komprimierende Tumoren und Fibrosen, oder auch durch Blasenentleerungsstörungen.

In der intrarenalen Form des ANV sind die Strukturen des Nephrons, also Glomeruli, Tubuli, Gefäße und das Interstitium betroffen¹. Die Spanne der Auslöser des intrarenalen Nierenversagens ist breit. Dieses kann sowohl eine lokale mikrozirkulatorische, wie dies auch bei den immunologisch bedingten Vaskulitiden und artheroembolischen Komplikationen auftreten kann, als auch eine makrozirkulatorische Störung zugrunde liegen, die aus einer initial prärenalen Ursache resultiert^{2,3}. Ebenso kann das intrarenale Nierenversagen toxisch, vermittelt durch Medikamente oder andere nephrotoxische Substanzen⁴, Röntgenkontrastmittel⁵, aber auch durch Proteinausfällung bei Rhabdomyolyse⁶ oder Leichtkettenmyelom, oder aufgrund starker Endothelschädigungen verursacht sein, wie beim Hämolytisch Urämischem Syndrom oder der Thrombotisch Thrombozytopenischen Purpura. Ebenfalls spielen beim intrarenalen akuten Nierenversagen infektiöse Ursachen, wie beispielsweise das HANTA-Virus, das HIV-Virus oder eine Leptospiroseerkrankung, eine nicht zu vernachlässigende Rolle. Häufig sind auch immunologische Erkrankungen, wie rasch progrediente Glomerulonephritiden, Auslöser eines akuten intrarenalen Nierenversagens.

Renale Ischämie und nephrotoxische Medikamente stellen zusammen 75% aller Fälle des akuten Nierenversagens dar⁵. Nicht selten findet sich aber im klinischen Bild des akuten Nierenversagens nicht nur ein auslösender Faktor.

Deskriptiv ist die akute tubuläre Nekrose (ATN) der wichtigste Faktor im ANV und stellt ein Endglied der auslösenden pathophysiologischen Prozesse dar. Obwohl die Begriffe akutes Nierenversagen und akute tubuläre Nekrose verschieden definiert sind, werden sie in der Klinik oft synonym gebraucht. Die pathogenetischen Faktoren der postischämischen ATN werden in Abbildung 1 zusammengefasst⁷.

Hierbei folgt das ANV, wie oben beschrieben, einer Minderperfusion der Niere⁸ hervorgerufen sowohl durch echte Hypovolämie, als auch durch Verminderung des effektiv zirkulierenden Blutvolumens, z.B. bei verminderter Auswurfleistung des Herzens, systemischer Vasodilatation oder intrarenaler Vasokonstriktion. Die Niere reagiert auf Änderungen der renalen Perfusion mit Autoregulationsmechanismen, die den renalen Blutfluss (RBF) und die GFR innerhalb relativ enger Grenzen konstant halten. Fällt der Blutdruck, erweitern sich die präglomerulären Arteriolen, vermittelt durch Prostaglandin I₂⁹ und Stickstoffmonoxid (NO)¹⁰. Im niedrigeren Bereich der Autoregulation trägt eine zusätzliche Konstriktion der postglomerulären Arteriolen zur Aufrechterhaltung des hydrostatischen Kapillardrucks in den Glomeruli bei, hauptsächlich unter dem Einfluss von Angiotensin II. Über den tubuloglomerulären Feedback-Mechanismus werden die GFR und der Flüssigkeitstransport zum distalen Nephron stabilisiert, so dass eine prärenale Reduktion der GFR gemildert werden kann^{8,11}.

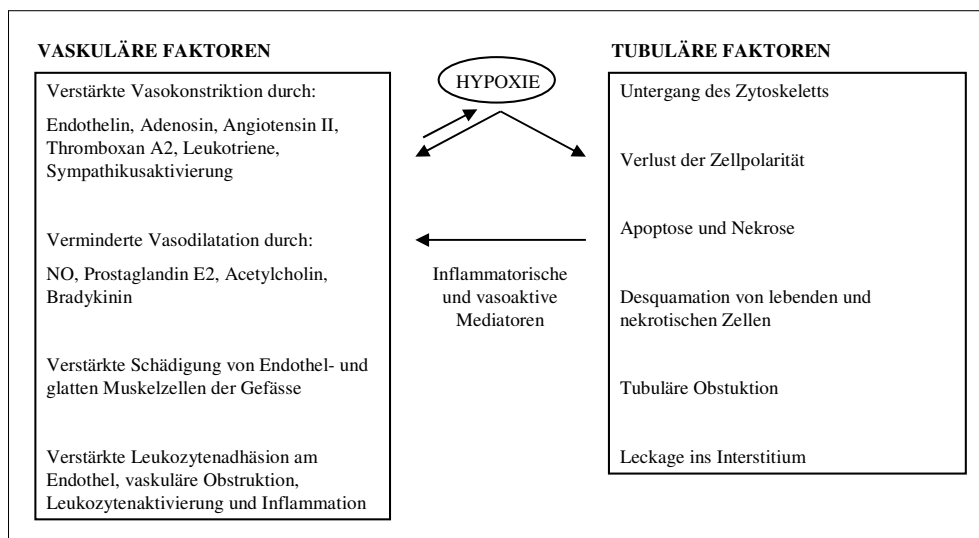


Abb. 1 Pathophysiologie des akuten ischämischen Nierenversagens (modifiziert nach Bonventre et al⁷).

Zwei Faktoren beeinflussen den akuten Abfall der GFR: Einerseits eine vaskuläre Komponente mit intrarenaler Vasokonstriktion, gefolgt von abfallendem Filtrationsdruck, Gefäßstauung in der äußeren Medulla und Aktivierung der tubuloglomerulären

Rückkopplung und andererseits eine tubuläre Komponente, bestehend aus tubulärer Obstruktion, transtubulärem Rückfluss des Filtrats und interstitieller Inflammation.

Die Blutversorgung der Niere beansprucht normalerweise 25% des kardialen Auswurfvolumens, jedoch ist der Sauerstoffpartialdruck innerhalb des Organs nicht einheitlich. Bereits grenzwertig oxygeniert sind die proximalen Tubuli und der dicke aufsteigende Teil der Henle-Schleife. Sie sind somit für eine Hypoxie hoch vulnerabel. Im Falle eines ANVs sinkt mit der renalen Perfusion der RBF um 30 – 50%, wobei eine selektive Drosselung der Blutversorgung in der äußeren Medulla beobachtet wurde^{12,13}. Die Vasokonstriktoren Angiotensin II, Thromboxan A₂, Prostaglandin H₂, die Leukotriene C₄ und D₄, Endothelin 1, Adenosin und eine erhöhte sympathische Stimulation werden damit in Verbindung gebracht. Die Bedeutung einer Schädigung der kortikalen Endothelzellen aufgrund von Ischämie und Reperfusion konnte durch Versuche mit implantierten Umbilikalvenenendothelzellen, die die endotheliale Stickoxidsynthase exprimieren, und dem daraus resultierenden funktionellen Schutz nachgewiesen werden¹⁴.

Histologisch führt die Ischämie zu einem Verlust des Aktin-Zytoskeletts¹⁵ und der Mikrovilli. Es kommt zur ATP-Depletion, verstärkter Aktivität der Phospholipasen und Azidose, intrazellulär erhöhen sich die Konzentrationen von freien Sauerstoffradikalen und Kalzium. Die Zellpolarität wird aufgehoben¹⁶, ersichtlich auch an der Relokation der Na-K-ATPase in die apikale Membran¹⁷. Die Zell-Zell-Kontakte lösen sich, Apoptose und Nekrose sind zu beobachten⁷. Die Zellen trennen sich von der Basalmembran, so dass die nun ineffektive Barriere der Basalmembran und der durch die Obstruktion erhöhte intraluminale Druck zum Übertritt des Filtrats ins peritubuläre Interstitium, zum sog. Back-leak, führen^{18,19}.

Im Verlauf der ATN können vier verschiedene Phasen unterschieden werden: Initialphase, Progression, Stabilisierung und Regeneration²⁰. Die Progressionphase ist gekennzeichnet durch eine fortbestehende Hypoxie und Entzündungsreaktionen²¹, besonders in der Rinden-Mark-Grenze. Inflammatorische Prozesse, an denen endotheliale und epitheliale Zellen genauso beteiligt sind wie Leukozyten und T-Zellen, spielen in der Pathophysiologie des akuten ischämischen Nierenversagens eine wichtige Rolle. Während der Reperfusion werden Chemokine und Zytokine freigesetzt, die die Entzündungsreaktion noch verstärken^{21,22}.

Die Inzidenz des ANVs liegt bei ca. 10 pro 100 000 Einwohner/Jahr, erhöhte Fallzahlen finden sich bei hospitalisierten Patienten, v. a. bei Schwerstkranken und Intensivpatienten²³. Das akute Nierenversagen stellt eine ernstzunehmende Komplikation dar, die Mortalitätsrate übersteigt 50%^{24,25}. Besonders hoch ist sie bei Patienten im Multiorganversagen^{23,26}. Trotz der Fortschritte in der Therapie hat sich die Mortalität nur geringgradig verbessert, allerdings ist zu bedenken, dass das Patientenkollektiv durchschnittlich älter ist und aufgrund chronischer Vorerkrankungen eine entsprechend erhöhte Morbidität vorliegt²⁷. Die Langzeitfolgen eines akuten Nierenversagens sind aufgrund der vielfältigen Ursachen der Erkrankung und dem Fehlen von Langzeitstudien nicht klar zu bestimmen. Da nach einem schweren ANV gewöhnlich eine zunehmende renale Dysfunktion beobachtet wird²⁸, ist die Regeneration der Niere möglicherweise nicht vollständig zur Restitutio ad integrum. Das ANV ist in 5% aller Fälle irreversibel, bei älteren Patienten sogar in bis zu 16%²⁹.

Die Therapiestrategien orientieren sich an den Kenntnissen, die man durch Untersuchung der Pathophysiologie gewonnen hat. Bezüglich der Verwendung von Diuretika und Dopamin konnte keine Verbesserung im Verlauf des ANV belegt werden³⁰. Pharmaka, die die Autoregulation stören, wie NSAR, ACE-Hemmer und Angiotension-II-Blocker, sollten mit Vorsicht angewendet werden. Hauptpunkte der Therapie sind nach wie vor lediglich supportive Maßnahmen, wie die Aufrechterhaltung eines ausreichenden intravasalen Volumens und die Vermeidung nephrotoxischer Stoffe. Vor allem bei Patienten mit Multimorbidität, die wie oben bereits beschrieben eine erheblich verschlechterte Prognose haben, sind dies die wichtigsten Maßnahmen.

1.2 Die Rolle des Häm-Hämoxigenase-Kohlenmonoxid-Systems im ANV

Hämoproteine spielen in vielen physiologischen Prozessen eine wichtige Rolle, z.B. dem Sauerstofftransport, der mitochondrialen Atmungskette und vielen Signaltransduktionswegen³¹. Der größte Anteil des Häms befindet sich im Hämoglobin, es stellt aber auch die prosthetische Gruppe von Myoglobin, mitochondrialen und mikrosomalen Cytochromen und vielen katalytischen Enzymen wie den Stickstoffsynthasen, Katalasen und Phagozytenoxidasen dar³². Freies Häm hat durch die Bildung von freien

Sauerstoffradikalen und Lipidperoxidation eine zytotoxische Wirkung³³⁻³⁶. Die Niere ist dabei besonders offen für freies Häm und häminduzierte Schäden, da es hier zu einer Kumulation der auslösenden Substanzen kommt. Unter anderem spielt freies Häm eine Rolle in den Pathomechanismen des ANV durch Rhabdomyolyse, Nephrotoxine und Ischämie-Reperfusion³⁷⁻³⁹.

Häm wird durch das Enzym Hämoxigenase (HO) abgebaut. Die äquimolar entstehenden Produkte sind Kohlenmonoxid (CO), Eisen und Biliverdin^{40,41}, welches durch die Biliverdinreduktase (BVR) weiter zu Bilirubin reduziert wird. Drei Isoformen der HO wurden bisher identifiziert: HO-1, HO-2 und HO-3^{40,42}. Die ubiquitär exprimierte, mikrosomale HO-1, auch HSP32 genannt, wird im Rahmen einer Gewebeschädigung durch viele verschiedene Stimuli induziert. Die Information für die mitochondriale HO-2 liegt auf einem anderen Genlocus. Sie hat mit der HO-1 bezüglich der Aminosäurestruktur nur eine 40%ige Übereinstimmung und wird primär in Gehirn, Hoden und Gefäßen exprimiert⁴³. In der Niere ist sie am stärksten im dicken aufsteigenden Teil der Henle-Schleife und in präglomerulären Arteriolen nachweisbar, in den proximalen Tubuli bedeutend schwächer. Sie stellt die konstitutive Isoform der HO dar, die als physiologischer Regulator der Zellfunktion dient⁴⁴. Die HO-3 kann in Milz, Leber, Thymus, Prostata, Herz, Niere, Gehirn und Hoden nachgewiesen werden. Strukturell besteht eine zur HO-2 90%ige Übereinstimmung in der Aminosäuresequenz. Sie besitzt keine katalytischen Fähigkeiten, sondern fungiert scheinbar durch Bindung an Häm als Häm-regulierendes Protein⁴².

Die für die Niere entscheidenden Isoformen sind HO-1 und HO-2, wobei die HO-1 aufgrund ihres zytoprotektiven Effekts und der antioxidativen, antiapoptischen und antiinflammatorischen Wirkung ihrer Produkte^{32,37,45} in den letzten Jahren Gegenstand zahlreicher Studien wurde^{32,38,45-53}.

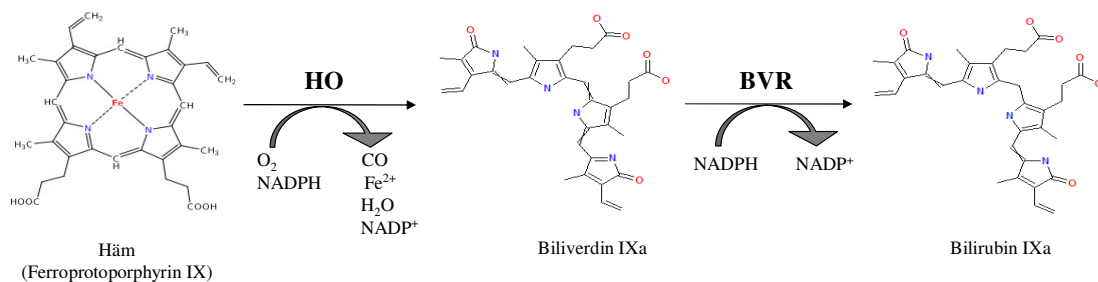


Abb. 2 Hämabbau durch die Hämoxigenase und die Biliverdinreduktase

1.2.1 Die induzierbare Hämoxigenase – HO-1

Die Induktion der HO-1 spielt in pathophysiologischen Abläufen einer Schädigung der Niere und anderer Organsysteme eine wichtige Rolle. So wurden protektive Effekte nachgewiesen bei akuten Nierenversagen infolge von Rhabdomyolyse³⁷, Transplantatabstoßung, Glomerulonephritis⁵⁴, Nephrotoxinen^{39,55} und Ischämie/Reperfusion^{38,56}.

Eine erhöhte Aktivität der HO-1 führt zur Spaltung des toxischen Prooxidanz Häm⁵⁷. Bilirubin fungiert als Radikalfänger und Antioxidanz. Es hemmt die Fettperoxidation und schützt die Zelle vor Überschuss an Wasserstoffperoxid (H₂O₂)⁵⁸. Die Induktion der HO-1 versetzt das Zellmilieu in einen antioxidativen Zustand. Zusätzlich wird Ferritin induziert, welches das beim Hämabbau entstehende intrazelluläre freie Eisen sequestriert³⁷. Das Gasprodukt CO hat einen mit Stickstoffmonoxid (NO) vergleichbaren vasodilatativen Effekt⁵⁹, außerdem wirkt es antiapoptotisch und zytoprotektiv. Dadurch, dass CO dem vasokonstriktorisches Effekt von Angiotensin II entgegenwirkt, welches seinerseits die HO-1 induziert, ergibt sich hier ein negativer Feedbackmechanismus. Eine Induktion der HO-1 beeinflusst zusätzlich die Expression vieler anderer Hämproteine, wie die Cyclooxygenasen und die Cytochrom P450 Monooxygenasen. Deren verminderte Aktivität zieht geringere Konzentrationen von konstriktorisches Mediatoren wie EDCF (endothelium-derived constricting factor), Endoperoxiden, Thromboxanen und HETE-20 (20-Hydroxyeicosatetraensäure) nach sich^{44,60,61}.

Allerdings entsteht auch freies Eisen, welches bei verstärkter HO-1-Aktivität akkumulieren kann und so prooxidativ wirkt, indem es Reaktionen freier Sauerstoffradikaler katalysiert⁶² und die Endothelzellen schädigt. Ebenso haben die anderen Produkte des HO-1 vermittelten Häm katabolismus negative Effekte. CO stimuliert die mitochondriale Produktion von freien Radikalen und geht mit der Hämgruppe von Hämproteinen eine Komplexbindung ein, wodurch deren Transport- oder Enzymfunktionen blockiert werden⁶³.

Es scheint, dass die Wirkung der HO-1 mit dem Ausmaß ihrer Induktion korreliert^{62,64}. Daher ist es von großer Bedeutung, die zugrunde liegenden Mechanismen der HO-1-Regulation zu identifizieren. Als einige wichtige Induktoren der HO-1, die zudem in der

Pathophysiologie von Nierenschäden eine Rolle spielen, gelten Häm, Hypoxie, NO, Zytokine, Endotoxin, Wachstumsfaktoren und Angiotensin II⁴³.

1.2.2 Kohlenmonoxid

CO wurde erstmals im späten 18. Jahrhundert beschrieben und bis vor kurzem nur als toxischer Luftschadstoff angesehen. Aus einem Sauerstoff und einem Kohlenstoffatom bestehend, wird dieses farb-, geruch- und geschmacklose Gas bei der unvollständigen Oxidation von kohlenstoffhaltigen Substanzen gebildet.

Endogen entsteht CO zu über 85% aus der Spaltung von Häm durch die HO. Außerdem wurde eine neue Stoffgruppe identifiziert, die CO-freisetzenden Moleküle (CORMs), die durch kontrollierte Freisetzung von CO in biologischen Systemen zu einer Vielzahl pharmakologischer Effekte fähig sind⁶⁵. Beschrieben wurden bereits CO-Donatoren, die Mangan (CORM-1), Ruthenium (CORM-2 und -3), Bor (CORM-A1) oder Eisen (CORM-F3) enthalten. Die therapeutische Relevanz dieser Stoffe wird zur Zeit untersucht⁶⁵⁻⁷¹.

Der toxische Effekt des CO beruht auf seiner hohen Affinität zum Hämoglobin, die fast 245mal so stark ist wie die von Sauerstoff⁷². Inzwischen konnte jedoch auch gezeigt werden, dass CO eine wichtige Rolle in der Regulation des Gefäßtonus und des Blutdrucks⁷³ spielt, da das aus dem Hämabbau stammende CO vasodilatativ wirkt⁷⁴⁻⁷⁶. Dies konnte in glatten Muskelzellen nachgewiesen werden, wo die Stimulation der löslichen Guanylatzyklase (sGC)⁴⁵ und kalziumabhängiger Kaliumkanäle^{59,77} durch CO eine Relaxation vermittelt. Eine Hemmung der HO verursacht im Gegenzug eine Gefäßkonstriktion^{73,78}. In vivo Studien deuten darauf hin, dass endogen produziertes CO einen vasodilatativen Effekt auf die Nierenperfusion ausübt, da die Hemmung der HO in einer Verminderung des renalen Blutflusses und der Exkretionsfunktion resultiert⁷⁹⁻⁸³.

Ähnlich dem Vasodilatator NO bindet CO mit gleicher Affinität an die Hämgruppe der sGC, allerdings ist die NO-vermittelte cGMP-Bildung 30 – 100mal höher als die durch CO vermittelte^{3,72}. Sowohl die induzierbare Stickoxidsynthase (iNOS), als auch die HO-1 werden aufgrund von Stress induziert. Die HO scheint dabei zum einen regulierend, zum anderen ergänzend auf die NOS zu wirken^{84,85}. Während NO als Induktor der HO-1 und somit der CO-Bildung agiert⁸⁶, scheinen HO-1 und CO als negativer

Rückkopplungsmechanismus der NOS-Aktivität zu dienen⁸⁷. NO ist nicht nur ein Vasodilatator, sondern als Molekül auch ein freies Radikal, das in einer Reaktion mit Hyperoxid (O_2^-) Peroxynitritradikale bildet. Es ist zu vermuten, dass die Regulation der NOS durch die HO-1 die Bildung freie Radikaler limitieren soll, während der vasodilatative Effekt durch CO-stimulierte cGMP-Bildung aufrechterhalten wird. In Nierengefäßen konnte außerdem eine antagonistische Wirkung gegenüber Angiotensin II gezeigt werden⁸⁰.

Die zytoprotektiven Eigenschaften von CO werden über die MAPK-Wege vermittelt. Es wurde gezeigt, dass CO die Inflammationskaskade, die einer endothelialen Schädigung folgt, moduliert, indem es die Produktion inflammatorischer Zytokine reduziert und im Gegenzug die von antiinflammatorischen Zytokinen verstärkt^{3,88,89}.

Somit scheint es offensichtlich, dass CO kein reines Abfallprodukt des Hämabbaus ist, sondern einen wichtigen Bestandteil physiologischer Schutzmechanismen der Zelle darstellt. Der Anwendung von CO als therapeutisches Agens stehen allerdings noch einige zu lösende Probleme gegenüber, nicht zuletzt die logistischen Schwierigkeiten, wie die Art der Applikation oder die Festlegung der protektiven Dosis.

1.2.3 Biliverdin und Bilirubin

Biliverdin, ein lineares Tetrapyrrol, ist das lösliche und nichttoxische Produkt der Hämringspaltung durch die HO, das unmittelbar durch die Biliverdinreduktase (BVR) zu Bilirubin umgewandelt wird. Es dient aber auch durch negative Rückkopplung der Regulierung der HO-Aktivität.

Das lipophile Bilirubin wird im Plasma zu > 99% an Albumin gebunden, so dass die Konzentration an freiem, unkonjugiertem Bilirubin zwischen 5 und 15 μ M liegt. Das konjugierte Bilirubin kann nicht mehr durch Zellmembranen diffundieren und die mitochondriale Atmungskette beeinträchtigen, was bei Konzentrationen >50 μ M auftritt⁹⁰. Allerdings kann Bilirubin seine toxische Wirkung entfalten, wenn die Albuminbindung übersättigt ist und die Konzentration des Bilirubins 200 – 300 μ M übersteigt⁹¹, oder wenn Bilirubin von Albumin dissoziiert, was bereits im Rahmen einer leichten Azidose (pH < 7,4) geschieht. Eine Hyperbilirubinämie wirkt sich zelltoxisch

aus, was klinisch besonders ausführlich bei neonataler Gelbsucht und Kernikterus beschrieben ist⁹². Die Frage, warum das nichttoxische, lösliche Biliverdin zu Bilirubin reduziert wird, blieb lange ungeklärt. Erst in den letzten drei Jahrzehnten wurden weitere Eigenschaften des Bilirubins entdeckt und seine physiologische Rolle näher analysiert.

Die größte zytoprotektive Eigenschaft des Bilirubins ist eine äußerst hohe antioxidative Aktivität⁹³. Das besondere an Bilirubin ist, dass es nicht einfach als stoichiometrisches Antioxidans wirkt, sondern mit Biliverdin und der BVR einen Redoxzyklus bildet, innerhalb dessen das zu Biliverdin oxidierte Bilirubin von der BVR sofort wieder reduziert wird. Dieser Prozess ermöglicht Bilirubin, die Zellen gegen 10.000fach höhere Konzentrationen an freien Radikalen zu schützen⁵⁸. Eine Reduktion oxidativen Stresses konnte sowohl in der Niere nach Ischämie⁵², als auch in Kardiomyozyten⁹⁴ und Neuronen⁹⁵ gezeigt werden. Bilirubin und Biliverdin bauen außerdem Peroxynitrit ab, ein hoch potentes Oxidans, das durch die Interaktion von NO und Hyperoxidanion-Radikalen entsteht⁹⁶.

Auch antiinflammatorische Eigenschaften können für Bilirubin nachgewiesen werden, so wurde gezeigt, dass Bilirubin isoliert die Leukozytenadhäsion an Endothelzellen inhibiert, was bereits schon unter HO-1 Induktion beobachtet wurde⁹⁷.

Diverse Studien zeigten bereits die positiven Auswirkungen von Bilirubin auf Ischämie/Reperfusionsschäden, unter anderem auch auf das ANV, so dass Strategien erprobt werden, exogenes Bilirubin therapeutisch einzusetzen⁹⁸⁻¹⁰⁰.

1.2.4 Biliverdinreduktase

Die Biliverdinreduktase (BVR), deren wichtige Bedeutung in der Detoxifikation freier Radikaler im Kapitel 1.2.3 bereits beschrieben wurde, ist ein lösliches Enzym, das durch ein single-copy-Gen kodiert wird und posttranslational reguliert wird. Sie ist das bisher einzige Enzym, das bei zwei pH-Optima und dementsprechend mit zwei Kofaktoren (NADH und NADPH) arbeitet. BVR besitzt nicht nur eine Reduktasedomäne, sondern fungiert auch als Serin-/Thyrosinkinase. Eine pH-abhängige reversible Autophosphorylierung wurde beschrieben, die für die Reduktaseaktivität essenziell ist. Interessanterweise ist das alkalische Milieu für die Autophosphorylierung

besser geeignet, da die Affinität der BVR für Adeninnukleotide im sauren Milieu vermindert ist. Diese Beobachtung korreliert mit der Tatsache, dass im sauren Milieu eine 10fach höhere Konzentration an Kofaktor benötigt wird¹⁰¹. Bilirubin inhibiert die Phosphorylierung und reguliert so im Sinne einer negativen Rückkopplung die Enzymaktivität¹⁰¹. Desweiteren wurde eine nukleäre BVR beschrieben, die durch Induktoren der HO-1 wie LPS und Brombenzene aktiviert wird, außerdem durch zyklisches Guanosinmonophosphat (cGMP)¹⁰².

1.2.5 Eisen

Neben Biliverdin und CO wird freies Eisen bei der Spaltung des Hämrings freigesetzt. Freies Eisen ist ein stark prooxidatives Molekül, da es im Rahmen der Fenton-Reaktion die Oxidation organischer Substrate mit Wasserstoffperoxid katalysiert und somit eine der Hauptquellen für reaktive Sauerstoffspezies darstellt. Ferritin und Transferrin, das ubiquitär vorkommende intrazelluläres Speicherprotein und das im Serum lokalisierte Transportprotein für Eisen, verhindern durch Bindung der Eisenionen deren toxische Eigenschaften. Die Induktion der HO-1 bringt eine Hochregulation von Ferritin mit sich, welches wiederum in der Lage ist, freies Eisen zu binden und somit seine prooxidative Wirkung zu unterbinden³⁷.

1.3 Die Modulation der Hämoxygenasen durch SnMP

Zinn(VI)-Mesoporphyrin (SnMP) gehört zu den Metalloporphyrinen. Es dient als hoch wirksamer Inhibitor der HO-1 und HO-2 und wurde als solcher bereits in vielen Studien bei Hyperbilirubinämie untersucht und bei neonatalem Ikterus bereits erfolgreich beim Menschen eingesetzt¹⁰³⁻¹⁰⁶.

SnMP bindet analog zu Häm an der HO und verhindert so durch kompetitive Hemmung die Konversion von Häm zu Biliverdin, CO und Eisen¹⁰⁷. Die hohe Affinität zur HO gegenüber anderen Proteinen wird der Möglichkeit zur axialen Bindung des Zinn an das aktive Zentrum des Enzyms zugeschrieben¹⁰⁸. Die ¹³⁹Gly – Asp – Leu – Ser – Gly – Gly¹⁴⁴-Sequenz wird als Schlüssel zur Spaltung des Hämrings angesehen. Es wurde beschrieben, dass Zinnporphyrine gerne eine Komplexbindung mit Alkoholen eingehen.

¹⁴²Ser substituiert vermutlich Wasser und koordiniert so die Bindung an Zinn, was zu einer kompletten Blockierung des aktiven Zentrums der HO führt¹⁴.

Obwohl SnMP die Aktivität beider HO senkt, aktiviert es die Genexpression der HO-1 und erhöht so die Proteinkonzentrationen der HO-1. Der Proteingehalt der HO-2 wird dagegen vermindert⁴⁴.

1.4 Die Rolle von Stickstoffmonoxid in der Niere

Stickstoffmonoxid (NO) ist ein biatomares und hochreaktives farbloses Gas, das in einer Vielzahl biologischer Prozesse eine wichtige Rolle spielt. Auf seine physiologischen Wirkungen wurde man Ende der 1970er Jahre aufmerksam. Im Rahmen von Untersuchungen an Blutgefäßen wurde die Substanz EDRF gefunden, die in den 80er Jahren dann als NO identifiziert werden konnte^{109,110}.

Im ANV spielt NO eine Doppelrolle, da es den Verlauf sowohl protektiv, als auch schädigend beeinflussen kann. Das lässt sich auf die beiden Signalwege zurückführen, an denen NO beteiligt ist. In niedrigen Konzentrationen wirkt NO als Signalmolekül, da es aufgrund seiner elektronischen Struktur frei durch zytosolische und membranöse Kompartimente diffundieren kann. Dadurch dient es auch als Ligand von Enzymen, die Häm als prostetische Gruppe enthalten, wie Cytochrom P450, NOS und sGC⁴⁷. Die NO-vermittelte Signaltransduktion läuft hauptsächlich über die Aktivierung der sGC und der Bildung von cGMP ab, welches Proteinkinasen, Phosphodiesterasen und Ionenkanäle reguliert und so physiologische Prozesse wie Vasodilatation, Inhibition der Plättchenaktivierung und der Leukozytenmigration modifiziert¹¹¹.

Höhere Konzentrationen an NO wirken unspezifisch innerhalb der Transduktionskaskaden des Immunsystems und sind an der Apoptose im Rahmen von Autoimmunreaktionen oder Transplantatabstoßung beteiligt. Diese durch Stickstoffradikale verursachten Zellalterungsprozesse werden analog zum oxidativen Stress als nitrosativer Stress bezeichnet. Dieser geht aber nicht direkt auf NO zurück, sondern auf eines seiner Folgeprodukte, Peroxynitrit (ONOO⁻), das aus NO und dem Hydroperoxydionradikal (O₂⁻) entsteht¹¹². Das Peroxynitrit ist aufgrund seines höheren Redoxpotentials bedeutend zytotoxischer als NO selbst. Oxidative Schädigung von Proteinen mit Entstehung von Nitrosotyrosin-Resten, Hemmung der Schlüsselenzyme der Atmungs-

kette und DNA-Synthese durch Nitrosylierung eisenhaltiger katalytischer Elemente und Fragmentation der DNA sind die Folge.

Unter physiologischen Bedingungen reguliert NO in der Niere das Urinvolumen und die Salzausscheidung. Es beeinflusst direkt den mikrovaskulären Tonus im Glomerulus im Sinne einer Dilatation des Vas afferens, was zu einer gesteigerten GFR führt¹¹³⁻¹¹⁵. Zusätzlich vermindert es die Empfindlichkeit des tubuloglomerulären Feedbackmechanismus¹¹⁶, bildet einen Gegenspieler zu Angiotensin II und möglicherweise auch zu einer neuronal stimulierten Vasokonstriktion¹¹⁷ und beeinflusst die Reninfreisetzung im juxtaglomerulären Apparat¹¹⁸. Die Salz- und Wasserausscheidung der Niere wird durch Modifizierung des renalen medullären Blutflusses reguliert¹¹⁹. Für die Natriumrückresorption wird viel Sauerstoff benötigt. Es konnte gezeigt werden, dass NO den mitochondrialen Sauerstoffbedarf vermindert und so Einfluss auf die Effektivität des Nierenmetabolismus nimmt¹²⁰. Ein möglicher Signalweg besteht über den Hypoxie-induzierten Faktor (HIF), besonders im bereits physiologisch niedrig oxygenierten Nierenmark¹²¹. Zytoprotektive Eigenschaften gewinnt NO durch die Bindung an Cytochromoxidase C in Mitochondrien, was den mitochondrialen Kalziumfluss verändert. Eine kalziumabhängige Serinprotease überführt daraufhin den stressregulierten Transkriptionsfaktor p90 (ATF6) in seine aktive Form, was zur gesteigerten Expression des zytoprotektiven Glukose-regulierten Protein 78 (Grp 78) führt. Somit wird die Stressregulation des endoplasmatischen Retikulums beeinflusst¹²². Außerdem tritt NO durch gleiche Signalziele, wie die lösliche Guanylatzyklase (sGC) und kalziumgesteuerte Kaliumkanäle¹²³, in Wechselwirkung mit dem Häm-HO-System. Unter anderem erhöht NO die Aktivität des eisenregulierenden Transkriptionsfaktors 1 (IRP-1), was die Transkription des Transferrinrezeptors steigert¹²⁴ und beeinflusst so den zellulären Eisenmetabolismus.

In pathophysiologischen Situationen wie z.B. Diabetes hat NO einen wichtigen Anteil an der Aufrechterhaltung des Blutdrucks¹²⁵. In der Pathogenese des Ischämie/Reperfusion-Schadens und der Abstoßung von Transplantaten spielt oxidativer Stress eine wichtige Rolle. NO verbessert in dieser Situation die Durchblutung, möglicherweise durch die Eigenschaft, die Überproduktion des Vasokonstriktor Endothelin (ET-1), die nach der Reperfusion auftritt, zu supprimieren^{126,127}.

Von großem Interesse ist, dass nicht nur unter pathophysiologischen, sondern auch unter physiologischen Bedingungen Hydroxidradikale neben NO auf die Nierenfunktion einwirken, und dass die Interaktion beider Systeme Einfluss auf das Ausmaß von Nierenschäden haben kann¹²⁸.

1.4.1 Die Stickoxidsynthese

NO wird aus der Aminosäure L-Arginin durch die Stickoxidsynthase (NOS) freigesetzt, ein dimeres Molekül, bestehend aus einer Reduktase und einer Oxygenase. In zwei Schritten wird L-Arginin über L-Hydroxyarginin zu L-Citrullin hydroxyliert^{129,130}; weitere Substrate sind Sauerstoff (O₂) und Nikotin-Adenin-Dinukleotid-Phosphat (NADPH), als Cofaktoren der Reaktion werden Flavin-Adenin-Dinukleotid (FAD), Flavin-Adenin-Mononukleotid (FMN) und Tetrahydrobiopterin (BH₄) benötigt^{131,132}. Essentiell für die Enzymaktivität, besitzt die NOS Bindungsstellen für Häm und kalziumbeladenes Calmodulin, das als Aktivator für den Elektronentransfer fungiert¹³³. Jedes eNOS-Dimer enthält außerdem ein Zink-Ion, welches für die Stabilisierung des dimeren Moleküls verantwortlich ist.

Es sind heute drei NOS-Isoformen identifiziert, von denen die endotheliale NOS (eNOS, NOS III) und die neuronale NOS (nNOS, NOS I) konstitutiv exprimiert werden, während die induzierbare NOS-Isoform (iNOS, NOS II) auf transkriptioneller Ebene induzierbar ist. Alle drei Isoformen haben eine hohe Sequenz-Homologie zur Cytochrom P450-Reduktase und sind in spezifischen Zelltypen lokalisiert.

Die Bildung von NO durch eNOS und nNOS wird durch Kalzium reguliert und ist unter physiologischen Bedingungen nicht vom extrazellulären L-Arginin-Angebot abhängig¹³⁴. Zelltypen, die die konstitutive NOS exprimieren, bilden in kurzen Zeitabständen kontinuierlich geringe Mengen NO. Das in Endothelzellen, Kardiomyozyten und Blutplättchen durch eNOS entstehende NO reguliert den Gefäßtonus und hemmt Plättchenaggregation und Leukozytenadhäsion¹¹¹.

nNOS findet sich in Neuronen, sowie in der Niere in der Macula densa und den efferenten Arteriolen¹³⁵. Sie ist an der Regulation der glomerulären Hämodynamik über die tubuloglomeruläre Rückkopplung und an der Freisetzung von Renin beteiligt¹¹⁸.

iNOS wird in Makrophagen, renalen Mesangial- und Tubuluszellen durch inflammatorische Zytokine wie LPS, Interferon γ , Interleukin-1 und TNF-alpha induziert. Im Gegensatz zu den konstitutiven NOS-Isoformen produziert sie große Mengen NO und ist kalziumunabhängig. Aufgrund der hohen Syntheserate besteht eine deutliche Abhängigkeit vom Angebot an L-Arginin¹³⁶.

Im ANV werden iNOS und eNOS als Gegenspieler angesehen. Während das durch iNOS gebildete NO Lipidperoxidation, DNA-Schäden und Apoptoseprozesse verursacht¹³⁴, spielt die endotheliale NOS eine große protektive Rolle¹³⁷.

Durch Versuche mit dem selektiven iNOS-Inhibitor L-N⁶-(1-Iminoethyl)-Lysin (L-Nil) konnte gezeigt werden, dass die Produkte der iNOS für die histologisch nachweisbaren Schäden der tubulären Epithelzellen verantwortlich sind¹³⁸. Die bereits unter 1.4 beschriebene Bildung von Peroxynitrit (ONOO⁻) wird für die durch iNOS hervorgerufenen Zellschäden verantwortlich gemacht. Außerdem scheint durch die hohe NO-Produktion der iNOS die Aktivität der eNOS supprimiert zu werden.

Die eNOS wird als die klassische vasoprotektive NOS angesehen, kann aber bei Substratdefiziten auch Hyperoxidationen statt NO bilden, da sie im Sinne einer NADPH-Oxidase entkoppelt, was als NOS-Entkopplung bezeichnet wird. Dies wird über die Häm-Gruppe der Oxygenasedomäne gesteuert und ist abhängig von der Verfügbarkeit des Substrats L-Arginin und des Kofaktors BH₄^{139,140}. Während dies den vorherrschenden Regulationsmechanismus darstellt, sind inzwischen Auslöser beschrieben worden, die die Aktivität der eNOS durch Beeinflussung der Expression und der zelluläre Kompartimentierung, durch Protein-Protein-Interaktionen und Phosphorylierungen modifizieren. Wichtige Auslöser sind dabei z.B. der auf Endothelzellen einwirkende Scherstress und erhöhte intrazelluläre Kalziumkonzentrationen. Neben Scherstress-gesteuerten Elementen in der Promoterregion der eNOS-cDNA sind Elemente beschrieben worden, die auf Östrogen, Sterole, cAMP und diverse Aktivatorproteine reagieren, z.B. das Aktivatorprotein 1 (AP-1), das in Anwesenheit von Immunsuppressiva wie Cyclosporin A aktiviert wird und so zur gesteigerten Expression von eNOS führt^{128,132}.

1.4.2 Die lösliche Guanylatzyklase

Das Enzym Guanylatzyklase (GC) dient als Katalysator für die Umwandlung von Guanosintriphosphat (GTP) zum zyklischen Guanosin-Monophosphat (cGMP) und ist Bestandteil vieler intrazellulärer Signalwege. In den 1970er Jahren wurden lösliche und membranständige Subtypen des Enzyms in fast allen Zelltypen beschrieben. Die membrangebundene GC, die als Rezeptor fungiert, reagiert nicht auf NO, da sie keine Häm-Gruppe enthält. Die lösliche GC (sGC) ist ein Heterodimer, bestehend aus einer alpha- und einer beta-Untereinheit mit Häm als prosthetischer Gruppe¹⁴¹. NO bindet an die Häm-Gruppe, die an einen His-105-Rest der beta-Untereinheit gebunden ist und führt zu einer Konformationsänderung, die einen bis zu 400fachen Anstieg der katalytischen Aktivität nach sich zieht¹⁴².

Die Hauptziele des NO-cGMP-Signalweges sind die Proteinkinasen G (PKG), Phosphodiesterasen (PDE) und zelluläre transmembranöse Ionenkanäle. Die Proteinkinase PKG I vermittelt durch Senkung der intrazellulären Kalziumkonzentration die Relaxation glatter Muskelzellen¹⁴³, vermindert die Plättchenaggregation durch Phosphorylierung des Thromboxan A₂-Rezeptors¹⁴⁴ und phosphoryliert das an der Neutrophilenaktivierung beteiligte Vimentin¹⁴⁵. PKG II wurde in juxtaglomerulären Renin-bildenden Zellen und verschiedenen Nephronsegmenten gefunden und ist an der Reninfreisetzung und dem Ionentransport in den Tubuli beteiligt¹⁴⁶. PDE hydrolysieren cGMP zu dem biologisch inaktiven GMP. Die Konzentration von cGMP ist also abhängig von dem Gleichgewicht zwischen den synthetisierenden (sGC) und den abbauenden Enzymen (PDEs)¹⁴⁷. Die Wirkung des cGMPs auf Kationenkanäle ist v. a. im Nervensystem von Bedeutung¹⁴⁸.

1.5 Arbeitshypothese

Das akute Nierenversagen zählt zu den häufigsten und kostenintensivsten Nierenerkrankungen. Trotz großer Fortschritte in der Dialyse- und intensivmedizinischen Therapie ist das ANV eine der Hauptursachen von Morbidität und Letalität im Krankenhaus. Die klinische Problematik und die komplexen pathophysiologischen Zusammenhänge machen es nicht nur zu einem Objekt von hohem wissenschaftlichem Interesse, sondern erklären auch das kontinuierliche Bestreben der Forschung, die einzelnen Faktoren und Schlüsselenzyme zu identifizieren und neue Behandlungswege zu erschließen.

Wie bereits beschrieben wurde, scheint die induzierbare Hämoxigenase (HO-1) einen protektiven Einfluss auf den Verlauf des ANVs zu haben. Ebenso bekannt ist die Möglichkeit, die HO-1 durch den Inhibitor SnMP zu blockieren. Unter Berücksichtigung dieses Sachverhaltes wird in der vorliegenden Arbeit überprüft, ob sich das ANV unter Verabreichung von SnMP verschlechtert. Da das HO-Produkt Kohlenmonoxid und das von der Stickoxidsynthase (NOS) gebildete Stickstoffmonoxid mit der löslichen Guanylatzyklase (sGC) dasselbe Zielenzym haben, ergibt sich nicht nur die Frage, wie die Niere auf eine Ausschaltung des schützenden HO/CO-Systems reagiert, sondern auch ob sich Auswirkungen auf das NOS/NO-System ergeben.

In dieser Arbeit soll im Tiermodell die Beeinflussung des CO/NO-Systems im akuten Nierenversagen durch Zugabe des HO-1 Inhibitors SnMP geprüft werden. Um die direkte Wirkung auf die Exkretionsfunktion der Niere im akuten ischämischen Nierenversagen zu bestimmen, wurden die Funktionsparameter Inulin- und PAH-Clearance über den Zeitraum von 14 Tagen gemessen.

Des Weiteren wurde auf molekularer Ebene mittels immunhistochemischer Proteinbestimmung die Veränderungen in den Konzentrationen und damit der Expression der an den Signalwegen beteiligten Enzyme bestimmt. Folgende Enzyme wurden dafür untersucht: Die Expression der HO-1, HO2, eNOS, sGC- β -Untereinheit (repräsentativ für die sGC) und BVR sowohl im Nierenmark, wie auch im Kortex aus 5 Stichproben aus einem 14-tägigen Versuchszeitraum.

2 Material und Methoden

2.1 Probengewinnung

2.1.1 Versuchstiere und Tierhaltung

Als Versuchstiere dienten weibliche CD-Ratten der Firma Charles River Deutschland GmbH. Das Gewicht der Tiere lag durchschnittlich bei 170-200g. Die Haltung erfolgte artgerecht entsprechend den Richtlinien des deutschen Tierschutzgesetzes. Die Tiere waren einem Hell-Dunkel-Zyklus ausgesetzt, erhielten Standardfutter und freien Zugang zum Trinkwasser. Die Unterbringung im Tierstall erstreckte sich über mindestens 24 Stunden vor der Operation. Die Tötung erfolgte gemäß den Richtlinien für Tierversuche.

2.1.2 Einteilung der Versuchsgruppen

Im Rahmen des Versuchsaufbaus wurden die Tiere nach der jeweiligen Behandlung in folgende fünf Gruppen eingeteilt.

Gruppe 1 stellte die „Clamping“-Gruppe dar, deren Tiere operativ einem akuten Nierenversagen durch beidseitiges Abklemmen der Nierenarterien unterzogen wurden. Das exakte Vorgehen wird unter 2.1.3 beschrieben.

Gruppe 2, der „Clamping + SnMP“-Gruppe, wurde nach dem Clamping der Hämooxygenaseinhibitor Sn⁴⁺Mesoporphyrin (Frontier Scientific Europe Ltd., Cornforth, Lancaster, England) intraperitoneal injiziert, während bei Gruppe 1 0,9%iges NaCl im gleichen Volumen verwendet wurde.

Gruppe 3 bestand aus den „Sham“-Tieren, bei denen in Analogie zur Gruppe 1 eine Scheinoperation mit der NaCl 0,9%-Applikation durchgeführt wurden, jedoch keine Ligatur der Nierenarterien.

Gruppe 4 war die „Sham + SnMP“-Gruppe und repräsentierte die Sham-Tiere, die einer Scheinoperation unterzogen wurden und statt der NaCl-Applikation eine SnMP-Injektion erhielten.

In den Gruppen 1 bis 4 wurde nach der beschriebenen Induktionsoperation eine im Intervall folgende Entnahme- und Messoperation durchgeführt.

Gruppe 5 diente als vergleichender Nullwert und stellte die Tiere dar, die unter gleichen Bedingungen gehalten wurden wie die Tiere aus Gruppe 1 bis 4, die aber bis zur Entnahme der Proben und der Messungen keiner Behandlung unterzogen wurden. Sie wurde darum als „Tag 0“-Gruppe bezeichnet.

2.1.3 Operation und Probenentnahme

Ziel der Voroperation war, die Ratten durch entsprechende Intervention den bereits beschriebenen Gruppen zuzuordnen und so den Ausgangspunkt für die vorliegende Versuchsreihe zu schaffen.

Zur Narkotisierung erhielten die Tiere Ketaminhydrochlorid (Ketavet[®], Pharmacia & Upjohn, Erlangen) in einer Dosierung von 100 mg/kg KG und Xylazinhydrochlorid 4% (Rompun[®], Bayer Vital, Aachen) in einer Dosierung von 10 mg/kg KG. Die Flanken wurden rasiert und die Augen mit Bepanthen Augen- und Nasensalbe (Hoffmann LA-Roche AG) vor Austrocknung geschützt. Um die Körpertemperatur konstant bei 37°C zu halten, wurden die Tiere während der Operation auf einer Wärmeplatte fixiert. Der Zugang erfolgte in Seitenlage über einen Paravertebralschnitt von ca. 2cm Länge, die Nieren wurden aus der Fettkapsel herauspräpariert und das versorgende Gefäßbündel dargestellt. Die A. renalis wurde von Vene und Ureter separiert und angeschlossen. Nachdem die Wunde mittels eines sterilen Pflasters (Tegaderm[®], 3M Health Care, Borken, Deutschland) abgedeckt wurde, konnte die andere Flanke gleichfalls eröffnet und präpariert werden. Im Folgenden wurden die Aa. renales für eine Dauer von 45 Minuten abgeklemmt. Nach 25 Minuten Klemmzeit wurden 0,75mg/100g KG SnMP, gelöst in 0,5ml 0,9%igem NaCl, intraperitoneal injiziert. Wie bereits erwähnt, erhielten die Gruppen Sham und Clamping lediglich 0,9% NaCl in gleicher Menge. Nach Ablauf der 45 Minuten Klemmzeit wurden zügig die Klemmen gelöst, die Bulkfäden entfernt und die Wunde mittels Muskel- und Hautnaht verschlossen. In der Aufwachphase bekamen die Tiere als Schmerzprophylaxe subkutan 2 mg/kg KG Tramadol (Tramal[®], Grünenthal GmbH, Aachen) gespritzt, außerdem 0,5 ml 0,9% NaCl, um den Flüssigkeitsverlust auszugleichen. Die intraperitoneale SnMP-Applikation erfolgte nicht

nur am Tag der Induktion des Nierenversagens, sondern in einem 24 stündigen Intervall maximal fünf Tage postinterventionell über erneute intraperitoneale Applikation.

Die Operation der Sham-Gruppen erfolgte nach dem gleichen Schema, jedoch ohne dass die Blutzufuhr der Nieren unterbunden wurde.

In der zweiten Operation wurden Urin- und Serumproben gewonnen, sowie die Nieren entnommen. Dies geschah am 1., 3., 7., sowie 14. postoperativen Tag.

Die Narkose erfolgte wiederum intraperitoneal nach bereits oben beschriebenem Schema. Nach Bestimmung des Operationsgewichtes wurden die Tiere in Rückenlage auf der Wärmeplatte fixiert. Der erste Schritt der Operation diente zur Gewinnung der Urinproben. Unter Abbinden und Koagulation kleinerer Gefäße wurden A. und V. inguinalis freigelegt. In die eröffnete V. inguinalis wurde ein heparinierter Katheter (Liquimin® N 25000, Hofmann La Roche AG) eingeführt, über den 1,3 ml eines in 0,9% NaCl gelösten Gemisches aus 0,24% Fluorescein Isothiocyanat Inulin und 0,2% Paraaminohippursäure (jeweils Firma Sigma-Aldrich, München, Deutschland), verabreicht wurden. 0,3 ml der Infusion wurden vorab im Bolus gegeben, die verbliebene Menge über einen Zeitraum von 50 Minuten mittels Perfusor bei einer Laufgeschwindigkeit von 1,2 ml/h appliziert. 20 Minuten nach der Bolusgabe wurde die Harnblase freigelegt und eröffnet, um einen Urinkatheter zu fixieren. Zur Bestimmung des Urinvolumens wurde an den Katheter eine Messpipette angeschlossen. Die Messung begann 30 Minuten nach Bolusgabe und endete nach weiteren 20 Minuten gleichzeitig mit der PAH-Inulin-Infusion. Im folgenden Schritt wurde das Abdomen eröffnet, die Aorta abdominalis freipräpariert und punktiert. Das entnommene Blut wurde in heparinisierte Glasröhrchen abgefüllt und zusammen mit den Urinproben für weitere Messungen zentrifugiert. Als letztes wurden zügig die Nieren entnommen. Um die Unversehrtheit der Zellen zu gewährleisten, wurden sie bis zum Einfrieren in Krebslösung (119,35 mM NaCl, 0,04 % KCl, 0,03 % CaCl₂, 11,94 mM KH₂PO₄, 11,94 mM MgSO₄, 25,84 mM NaHCO₃) gelagert.

Während aus der linken Niere ein Querschnitt entnommen wurde, der separat in Isopentan eingefroren wurde, erfolgte die Zerteilung der rechten Niere entsprechend der makroskopischen Einteilung in Cortex und Medulla. Sämtliche Organe wurden in flüssigen Stickstoff gefroren und bei -80°C aufbewahrt.

2.2 Inulinmessung

Als ein Maß für die Exkretionsfähigkeit der Niere wird die Inulin-clearance bestimmt. Diese korreliert sehr gut mit der glomerulären Filtrationsfraktion (GFR). Sie stellt das Flüssigkeitsvolumen dar, das pro Zeiteinheit von allen Glomeruli der Niere filtriert und auch als Primärharn bezeichnet wird.

Um die GFR messen zu können, wird dem Blut die Indikatorsubstanz Inulin, ein disperses Polymer der Fruktose mit einem Molekulargewicht von 5 kDa, zugeführt. Sie erfüllt folgende Bedingungen: sie ist einerseits frei filtrierbar, die filtrierte Menge wird aber weder durch Rückresorption, noch durch Sekretion verändert und wird außerdem nicht verstoffwechselt, andererseits beeinträchtigt sie nicht die Nierenfunktion.

Die GFR lässt sich mit folgender Formel durch die gemessenen Parameter

näherungsweise berechnen:
$$GFR = \frac{V_U \cdot U_{In}}{P_{In}} [ml / min]$$

mit V_U = Urinvolumen pro Zeit, U_{In} = Inulinkonzentration in Urin und P_{In} = Inulinkonzentration im Plasma.

Die Messung der Inulinkonzentration erfolgte photometrisch. Je 10 ml der Urin- bzw. Serumproben wurden in einer 1:500 Verdünnung in einem Puffer gelöst, der aus 1,15 g TES (N-tris[Hydroxymethyl]methyl-2-amino-ethanesulfonicacid) und 1,00 g MES (2-[N-Morpholino]ethanesulfonicacid) in 1 Liter Aqua dest. bestand und mit 1N NaOH auf einen pH-Wert von 7,4 eingestellt wurde. Zur Korrelierung der Messwerte wurde ein Inulinstandard eingesetzt. Proben, Standards und Puffer wurden in eine 96-well-Messplatte pipettiert und mittels Fluoreszenz-Photometer (1420 VICTOR² multilabel counter, Wallace, USA) mit einer Wellenlänge von 480 nm angeregt. Die Emissionswellenlänge betrug 520 nm. Die gemessene Emission ist direkt proportional zur Inulinkonzentration, sodass die einzelnen Clearancewerte anhand obiger Formel berechnet werden konnten.

2.3 Immunhistochemische Proteinbestimmung

2.3.1 Probenvorbereitung

Die gefrorenen Gewebeproben aus Cortex und Medulla wurden auf Eis in Glashomogenisatoren aufgearbeitet und jeweils 100 mg Gewebe wurde in 1 ml Lysispuffer homogenisiert. Dieser bestand aus einer Lösung aus 25 mM 4-(2-Hydroxyethyl)-1-Piperazinethansulfonsäure (HEPES[®], Fa. Sigma-Aldrich, München, Deutschland), 125 mM NaCl, 1% Octylphenol-5M-Ethoxylat (Igepal[®], Fa. Sigma-Aldrich, München, Deutschland), 10mM MgCl₂, 1mM EDTA und 2% Glycerol mit einem pH von 7,4, in dem auf 10ml 1 Comprette (Protease Inhibitor Tabl. Complete Mini[®], Roche) eines Proteaseinhibitorcocktails (1,5 µg/ml Chymotrypsin, 0,8 µg/ml Thermolysin, 1 mg/ml Papain, 1,5 µg/ml Pronase, 1,5 µg/ml Pankreasextrakt, 0,2 µg/ml Trypsin) gelöst wurde. Die unlöslichen Bestandteile wurden durch zweimaliges zehnmütiges Zentrifugieren bei 4°C und 15.000 Umdrehungen abgesetzt und das Pellet verworfen.

Um die Proteinkonzentration des Homogenisat zu bestimmen, wurde die photometrische Proteinbestimmung nach Bradford¹⁴⁹ angewendet. Dabei komplexiert Cromassie Brilliant Blue mit Proteinen durch Bindung an basische oder aromatische Aminosäuren, wodurch sich das Absorptionsmaximum des Farbstoffes von 465nm auf 595nm verschiebt. Die Proteinmenge des Homogenisats kann dann im Vergleich zu der Eichkurve eines Proteinstandards mit bekannter Konzentration quantifiziert werden. Zur Quantifizierung wurden je 10µl der Proben 10-fach mit Lysispuffer verdünnt und als Dreifachbestimmung in eine Mikrotiterplatte pipettiert. Eine Standardreihe (Fa. Sigma-Aldrich, München, Deutschland) wurde zur Normierung eingesetzt. Alle Proben wurden daraufhin mit 50µl PBS (1,37 M NaCl, 27 mM KCl, 1,5 mM KH₂PO₄, 0,08 M Na₂HPO₄ + 2H₂O, pH 7,2 – 7,4) und 250µl Bradford-Reagenz (0,01 % Cromassie Brilliant Blue, 5 % Ethanol abs., 8,5 % Phosphorsäure; Fa. Sigma-Aldrich, München) verdünnt und im Photometer bestimmt. Das restliche Homogenisat wurde im Verhältnis 2:1 mit Probenpuffer (200 mM Trishydroxymethyl Aminomethane Buffer, 6 % SDS, 15 % Glycerol, pH 6,7, 0,6 % Bromphenolblau, 10 % Mercaptoethanol) versehen. Um eine definierte Proteinkonzentration von 1 µg/ml zu erhalten, wurde den einzelnen Proben

noch eine der Proteinbestimmung entsprechende Menge Lysispuffer mit Probenpuffer im Verhältnis 2:1 hinzugefügt.

Die Lysate wurden daraufhin 5 min bei 95°C gekocht. Die Zugabe von SDS und die Erhitzung führen durch die Spaltung von Wasserstoffbrückenbindungen zur Zerstörung der Quartär- und Tertiärstrukturen der Proteine. Durch die Verwendung von 2-Mercaptoethanol wurden zusätzlich auch Disulfidbrücken gespalten. Anschließend wurden die Proben nochmals abzentrifugiert und gemischt. Zur leichteren Weiterverwendung in der Gelelektrophorese wurden die Proben zu je 30µl aliquotiert und dann bei -20°C gelagert.

2.3.2 Auftrennung der Proteine in der SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese nach Lämmli¹⁵⁰

Die Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) wird benutzt, um die Proteine entsprechend ihres Molekulargewichtes aufzutrennen, während sie in einem elektrischen Feld in Richtung Kathode wandern.

Hierbei werden zwei Gelkomponenten verwendet, die sich im pH-Wert und Verhältnis ihrer Bestandteile unterscheiden. Als solche entscheidend sind Polyacrylamid (30% Acry+Bis-Acrylamid, Rotiphorese Gel 30[®], Carl Roth GmbH u. Co), durch dessen Konzentration die Porengröße des Gels bestimmt wird, und anionisches Natriumdodecylsulfat (SDS), welches die Ladung der einzelnen Proteine maskiert. Die Polymerisation des Gels erfolgt durch Zugabe von Tetramethylethyldiamin (TEMED).

Die Geltaschen des weitporige 3%ige Sammelgels (0,5 M Trishydroxymethyl Aminomethan Puffer pH 6,7, 0,1% SDS, 0,4% APS, 0,05% TEMED) wurden mit 25µg Protein, vorgefärbten Standards definierten Molekulargewichtes (Seebblue Plus 2 Prestained[®] und Seebblue Prestained[®], Invitrogen) und Positivkontrollen einzelner Proteine beladen. Die Auftrennung erfolgte in dem engporigen 10%igen Trenngel (3 M Trishydroxymethyl Aminomethan Puffer pH 8,9, 0,1% Sodiumdodecylsulfat (SDS), 0,1% Amoniumpersulfat (APS), 0,05% TEMED). Anschließend wurde die mit Laufpuffer (25 mM Tris, 250 mM Glycine, 0,1 % SDS) aufgefüllte Gelelektrophoresekammer (Peqlab Biotechnologie GmbH) an die

Stromquelle angeschlossen. Die Auftrennung erfolgte bei 300 V mit 40 Am pro Gel, die Laufzeit betrug 1,5 bis 2 Stunden. In dieser Zeit wurde die Kammer an ein Kühlsystem angeschlossen, um eine konstante Temperatur während der Elektrophorese zu gewährleisten.

2.3.3 Westernblot

Im Westernblot¹⁵¹ werden die Proteine, die zuvor in der Gelelektrophorese aufgetrennt wurden, durch ein senkrecht zum Gel stehenden elektrischen Feldes auf eine Membran transferiert. Dadurch erreicht man die Immobilisierung der Proteine und macht sie gleichzeitig für die Detektion durch Antikörper zugänglich.

Im Folgenden wurden die Proteine im Tank-Blot-Verfahren (Westernblot System[®], Biorad) auf Polyvinylidifluorid-Membranen (Hybond PVDF Membran[®], Amersham Biosciences) transferiert. Gel und Membran wurden, von beiden Seiten von einer Lage Filterpapier und einem Schwamm umschlossen, in den Gelhalter eingespannt und in die Transferkammer eingesetzt. Diese wird mit Transferpuffer (25 mM Tris, 19 mM Glycine, 20% Methanol, 100 mM, NaOH, pH 10) aufgefüllt und an die Stromquelle angeschlossen. Der Blotvorgang erfolgte unter Kühlung bei konstanter Stromstärke von 2 Ampere, je nach Zielprotein über eine Dauer von 90 bis 120 Minuten.

2.3.4 Immunchemischer Antigen-Nachweis

2.3.4.1 Verfahren

Die Visualisierung der gebundenen Proteine erfolgt mittels Immunodetektion. Das auf der Membran fixierte Protein wird dazu durch einen spezifischen primären Antikörper gebunden. Dieser wiederum wird mittels eines sekundären Antikörpers detektiert, welcher an das F_c-Fragment des Erstantikörpers bindet. An den Zweitantikörper ist eine Horse Radish Peroxidase gekoppelt.

Um den Blot mit spezifischen Antikörpern inkubieren zu können, müssen erst die unspezifischen freien Bindungsstellen auf der Membran abgesättigt werden. Dieses Blockieren erfolgt unter Verwendung von Proteinen wie Milchpulver, Rinderalbumin

und Ziegen Serum, da diese eine für die Erstantikörper nicht erkennbare Struktur besitzen.

Verwendet wurde hier 5% Milchpulver in TBST (20 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 7,5, 0,5 % Polyoxyethylen-Sorbitan-Monolaurat, Tween 20[®]) oder ein modifizierter Blockierungspuffer mit 0,5% Rinderalbumin (Bovine Serum Albumin, Fraction V[®], Fatty-Acid Free, Calbiochem) und 2% Ziegen Serum (Normal GOAT Serum[®], Vektor Laboratories) zusätzlich. Die Blockierung erfolgte entweder 1h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C. Nachdem der Blockierungspuffer verworfen wurde, erfolgte die Inkubation mit dem spezifischen Erstantikörper. Dieser wurde in Blockierungspuffer gelöst, wobei das Lösungsverhältnis der verwendeten Antikörper individuell nach Angaben des jeweiligen Herstellers differierte (siehe Tabelle 1).

<i>Antikörper</i>	<i>Konzentration</i>
BVR	1:2000
HO1	1:2000
HO2	1:10000
β-Aktin	1:400000
TfR	1:2000
Transferrin	1:1000
eNOS	1:2000

Tab. 1 Antikörper-Konzentrationen

Im Folgenden wurden die Membranen viermal 5 min in TBST gewaschen und mit dem Zweitantikörper, der im Verhältnis 1:2000 in Blockierungspuffer gelöst wurde, inkubiert. Sowohl Erst-, wie auch Zweitantikörper verblieben entweder 1 h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C auf den Membranen.

Nach dem Inkubationsintervall des Zweitantikörpers wurde dieser verworfen und die Membranen mit jeweils zweimal 5 min mit TBST und anschließend mit TBS (20 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 7,5) gewaschen.

2.3.4.2 Antikörper und Positivkontrollen

<i>Erstantikörper:</i>	
Rabbit Anti-Heme-Oxygenase-1 Polyclonal Antibody	Stressgene Bioreagents
Rabbit Anti-Heme-Oxygenase-2 Polyclonal Antibody	Stressgene Bioreagents
Rabbit Anti-Biliverdin reductase Polyclonal Antibody	Stressgene Bioreagents
Mouse Monoclonal Anti-β-Aktin	Sigma
Rabbit Anti-Human Transferrin	DAKO
Mouse Anti-Human Transferrin Rezeptor	Zymed Laboratories Inc.
Mouse Anti-eNOS/NOS Type III	BD Transduction Laboratories
<i>Zweitantikörper:</i>	
Peroxidase-conjugated Goat anti-mouse IgG	DAKO
Peroxidase-conjugated Goat anti-rabbit IgG	DAKO
Donkey anti-rabbit IgG-HRP	Santa Cruz Biotechnology
<i>Positivkontrollen:</i>	
Recombinant rat or human HO-1 protein	Stressgene Bioreagents
Recombinant human HO-2 protein	Stressgene Bioreagents
Recombinant rat kidney biliverdin reductase	Stressgene Bioreagents
Human eNOS	BD Transduction Laboratories

Tab. 2 Antikörper und Kontrollproteine

2.3.4.3 Chemolumineszenz

Die Entwicklung des Blot erfolgt unter Verwendung der Amersham ECL plus Western Blotting Detection Reagents. Dieses System basiert auf der Oxidation von Lumigen PS-3 zu Acridiniumestern durch die an den Zweitantikörper gekoppelte Horse Radish Peroxidase. Vergleichbar mit Luminol emittieren diese Ester Photonen, die mittels eines Röntgenfilmes (Röntgenfilme „Medical X-Ray“[®], Fuji Film) als Proteinbanden sichtbar gemacht werden.

Entsprechend der Herstelleranweisung wurden die Membranen für 5 Minuten mit dem ECL-Reagenz beschichtet und danach zwischen zwei Folienblätter in eine Röntgenkassette eingelegt. Die Belichtung und Entwicklung der Röntgenfilme fand in der Dunkelkammer statt.

2.4 Software und Statistik

Im Folgenden wurden die Röntgenfilme unter Verwendung der Hewlett Packard Precisionscan Software eingescannt. Die digitalisierten Bilder wurden mit Hilfe des Programms Quantity One (Biorad, USA) weiterbearbeitet und die Schwärzung der Banden densitometrisch bestimmt.

Für die statistischen Berechnungen wurde das Programm Microsoft Excel für Windows XP unter Anwendung des Student-t-Tests für ungepaarte Gruppen genutzt.

2.5 Geräte und Chemikalien

2.5.1 Geräte

<u>Geräte</u>	<u>Hersteller</u>
Fluoreszenz-Photometer 1420 VICTOR² multilabel counter	Wallace, USA
Photometer „ELISA-Reader MRX“	DYNATECH Lab., USA
Electrophoresis Power Supply EPS 301	Amersham Pharmacia Biotech
Power Pac 200 für Westernblot	Biorad, USA
Kühlsystem	Haake D1
Vortex: Cuv-o-Mix	Helma
Rollinkubator	Assistent Cat RMS
Hybridisierungsöfen	Techne HB-1D
pH-Meter pH 720	WTW inoLab
Entwickler „Optimax“	Protec

Tab. 3 Geräteliste

2.5.2 Chemikalien

Einzelsubstanzen und Grundstoffe für Lösungen und Puffer wurden, wenn im Text nicht extra vermerkt, von den Firmen Sigma-Aldrich, Merck und Carl Roth GmbH u. Co. bezogen.

3. Ergebnisse

3.1 Verlauf der funktionellen Parameter im ANV

Um die Nierenfunktionswerte zu bestimmen, wurden die Inulin-Clearance als Parameter für die glomeruläre Filtrationsfraktion (GFR) und die PAH-Clearance gemessen.

Die Inulin-Clearance der nativen Versuchstiere zum Versuchstag 0 betrug $0,84 \pm 0,12$ ml/min/kg KG und die PAH-Clearance $2,68 \pm 0,32$ ml/min/kg KG.

Sowohl in der Clamping- als auch in der Clamping + SnMP-Gruppe kam es am ersten postoperativen Tag zu einem starken Abfall dieser Funktionswerte. Die Inulin-Clearance der Clamping-Gruppe fiel zu diesem Zeitpunkt auf $0,16 \pm 0,02$ ml/min/kg KG. Von diesem niedrigsten Clearancewert erholten sich die Funktionswerte und zeigten einen fast linear ansteigenden Verlauf im folgenden Versuchszeitraum. Am Tag 3 wurde eine Inulin-Clearance von $0,21 \pm 0,02$ ml/min/kg KG gemessen, am Tag 7 von $0,31 \pm 0,07$ ml/min/kg KG und am Tag 14 von $0,45 \pm 0,06$ ml/min/kg KG, was 53% des Ausgangswertes am Tag 0 darstellt.

Ein vergleichbarer Ablauf ließ sich bei der PAH-Clearance beobachten. Nach dem Eingriff sank der Wert am ersten postoperativen Tag auf einen Tiefpunkt von $0,85 \pm 0,08$ ml/min/kg KG, um dann ebenfalls kontinuierlich anzusteigen. Am Tag 3 lag der Funktionswert bei $0,99 \pm 0,08$ ml/min/kg KG, am Tag 7 bei $1,23 \pm 0,19$ ml/min/kg KG und zum Versuchsende erreichte er mit $1,57 \pm 0,13$ ml/min/kg KG bereits wieder 58 % des Ausgangswertes.

Die Clamping + SnMP-Gruppe reagierte auf die Ischämie vergleichbar der Clamping-Gruppe, zeigte aber am 1. und 3. Tag einen abweichenden Verlauf der Funktionsparameter. Auch in dieser Gruppe ließ sich bereits am ersten postinterventionellen Tag ein Minimum in der Inulin- und PAH-Clearance feststellen. Die Inulin-Clearance lag hier bei $0,06 \pm 0,01$ ml/min/kg KG und war damit im Vergleich zur Clamping-Gruppe ohne SnMP-Medikation signifikant deutlich reduziert. Am Tag 3 kam es zu einem etwas ruckartigen Anstieg auf $0,26 \pm 0,03$ ml/min/kg KG, am Tag 7 dafür glich sich die Inulin-Clearance mit $0,30 \pm 0,05$ ml/min/kg KG an den Kurvenverlauf der Clamping-Gruppe an. Am Tag 14 betrug der Wert dementsprechend $0,45 \pm 0,06$ ml/min/kg KG.

Die PAH-Clearance der Clamping + SnMP-Gruppe sank an Tag 1 auf $0,35 \pm 0,08$ ml/min/kg KG und hob sich damit analog zur Inulin-Clearance signifikant von der Clamping-Gruppe ab. Am Tag 3 stieg sie aber wieder auf $1,15 \pm 0,13$ ml/min/kg KG, während es am Tag 7 nochmals zu einem geringen Abfall der Clearance auf $1,10 \pm 0,11$ ml/min/kg KG kam. Damit unterschritt die PAH-Clearance der Clamping + SnMP-Gruppe den der Clamping-Gruppe, jedoch ohne signifikanten Unterschied. Auch während des restlichen Versuchsverlaufs zeigte sie einen Trend zu Werten unterhalb denen der Clamping-Gruppe. Am Tag 14 wurde eine PAH-Clearance von $1,44 \pm 0,22$ ml/min/kg KG gemessen.

Zusammenfassend lassen sich signifikante Unterschiede zwischen den beiden Gruppen am ersten postinterventionellen Tag beobachten, sowohl bezüglich der Inulin-, wie auch der PAH-Clearance.

Bei der Sham-Gruppe lag die Inulin-Clearance präoperativ bei $0,74 \pm 0,06$ ml/min/kg KG, was den Ausgangswert der anderen Gruppen am Tag 0 unterschritt, jedoch ohne signifikanten Unterschied. Insgesamt zeigte sich postinterventionell nach der Shamoperation eine nur sehr geringe Beeinträchtigung der Nierenfunktionswerte. So fiel die Inulin-Clearance der Sham-Gruppe am Tag 1 nur auf $0,60 \pm 0,03$ ml/min/kg KG, was 81% der Inulin-Clearance am Tag 0 entspricht und unterscheidet sich damit deutlich signifikant sowohl von der Clamping-Gruppe mit einem Abfall auf 19% und der Clamping + SnMP-Gruppe mit einer Reduktion auf 7% der am Tag 0 gemessenen Inulin-Clearance. Im Weiteren stabilisierte sich die Funktion mit $0,62 \pm 0,12$ ml/min/kg KG am Tag 3, $0,60 \pm 0,06$ ml/min/kg KG am Tag 7 und $0,63 \pm 0,03$ ml/min/kg KG am Tag 14.

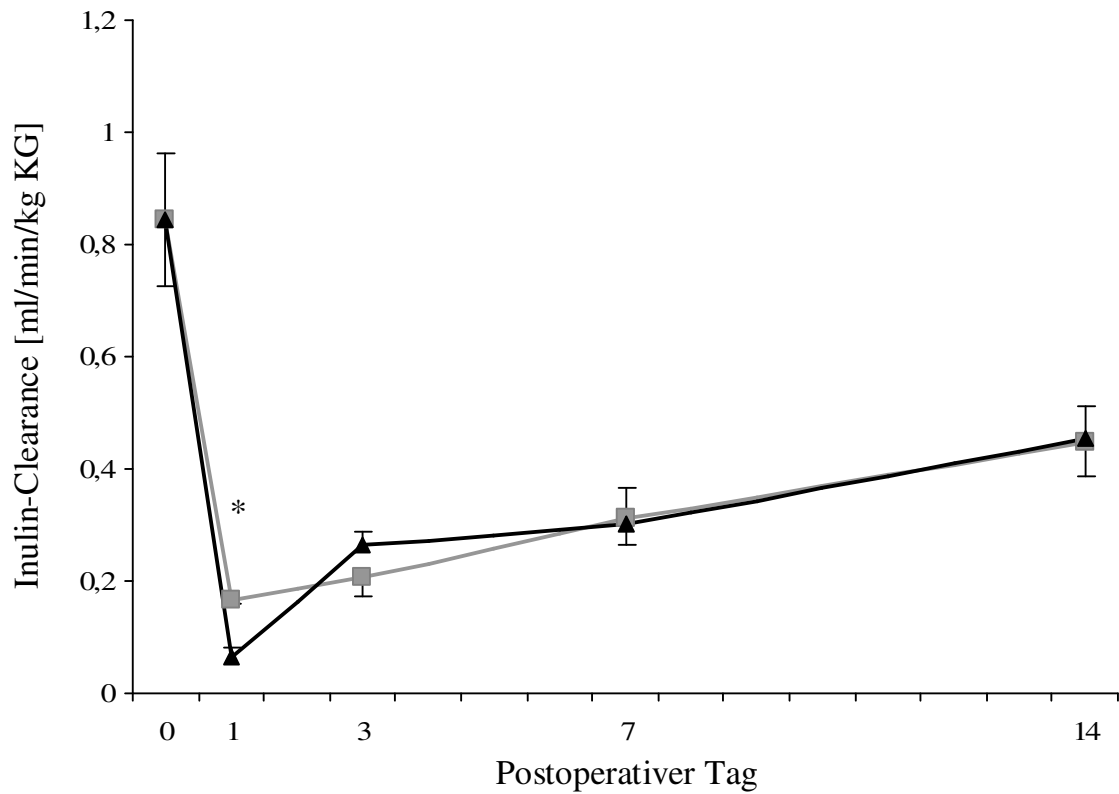


Abb. 3 Inulin-Clearance der Clamping- (graue Linie/Quadrat) und der Clamping + SnMP-Gruppe (schwarze Linie/Dreieck) im postinterventionellen Verlauf von 14 Tagen nach akuten ischämischen Nierenversagen (jeweils n = 5-9, * = p < 0,05)

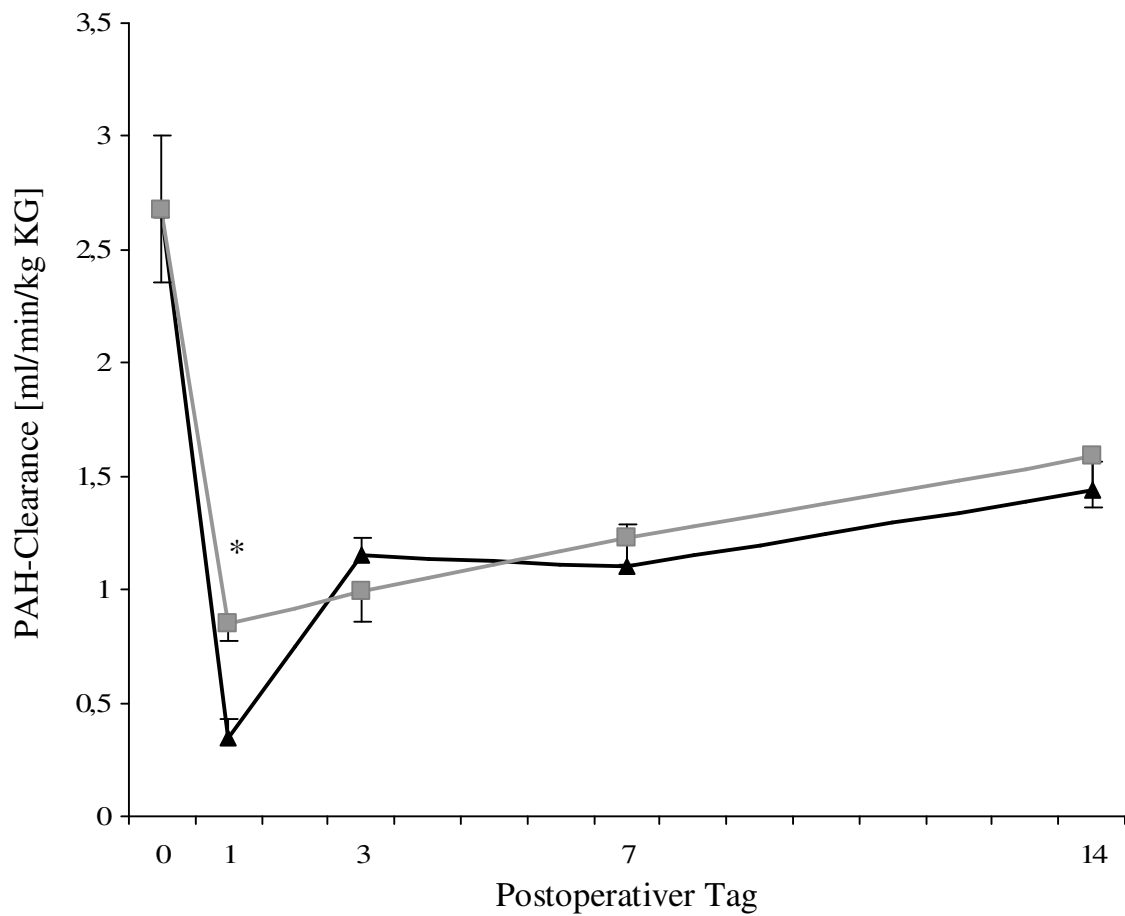


Abb. 4 PAH-Clearance der Clamping- (graue Linie/Quadrat) und der Clamping + SnMP-Gruppe (schwarze Linie/Dreieck) im postinterventionellen Verlauf von 14 Tagen nach akuten ischämischen Nierenversagen (jeweils n = 5-9, * = p < 0,05)

3.2 Die Auswirkung von SnMP auf die Expression der Hämoxxygenase-1 im akuten ischämischen Nierenversagen

3.2.1 Expression der Hämoxxygenase-1 im Kortex

Im Rahmen des Versuchsaufbaus wurde postoperativ in allen Versuchsgruppen eine Hochregulierung der Hämoxxygenase-1-Expression (HO1) in der Nierenrinde beobachtet, mit einem Maximum am ersten postinterventionellen Tag. Die Clamping-Gruppe zeigte dabei einen Maximalwert von $1372 \pm 383 \%$, dem jedoch ein rascher Abfall am Tag 3 auf $329 \pm 123 \%$ folgte. An den Tagen 7 und 14 sank der Proteingehalt der Clamping-Gruppe weiter auf $258 \pm 107 \%$ bzw. auf $114 \pm 15 \%$ des Ausgangswertes. Ein signifikanter Unterschied zeigte sich zu Tag 0 an den Tagen 1 und 3.

Die HO1-Expression der Clamping + SnMP-Gruppe erreichte mit $1424 \pm 341 \%$ ebenfalls ihr Maximum bereits am 1. postoperativen Tag. Im Verlauf unterschied sich diese Gruppe jedoch von den anderen durch eine konstant stärkere Überexpression und einen langsameren, linearen Abfall. Am 3. Tag lag der Proteingehalt bei $937 \pm 226 \%$, sank dann am Tag 7 auf $706 \pm 171 \%$ und erreichte am Tag 14 einen Endwert von $364 \pm 109 \%$ des Ausgangsniveaus Tag 0. Damit unterschied sich die Clamping + SnMP-Gruppe von den Tag-0-Tieren signifikant an den Tagen 1, 3 und 7.

Die Sham-Gruppe setzte sich von den beiden vorher genannten durch eine geringere Expressionsänderung der HO1 ab. Ihr Maximalwert am 1. postoperativen Tag zeigte eine Hochregulation von nur $561 \pm 285 \%$, welcher sich signifikant von der Kontrollgruppe an Tag 0 abhob. Im Folgenden fielen die Werte der Sham-Gruppe ebenfalls stetig ab. Am Tag 3 betrug die Expression noch $210 \pm 75 \%$, an den Tagen 7 und 14 dagegen ließ sich im Vergleich zu der Tag 0-Gruppe kein signifikanter Unterschied mehr feststellen.

Während sich die Clamping + SnMP-Gruppe am Tag 1 noch nicht signifikant von der Clamping-Gruppe abheben konnte, war ein signifikanter Unterschied im Verlauf an den Tagen 3, 7 und 14 gegeben. An Tag 1, 3 und 7 war die Expression der HO1 in der Clamping + SnMP-Gruppe gegenüber der Sham-Gruppe signifikant erhöht.

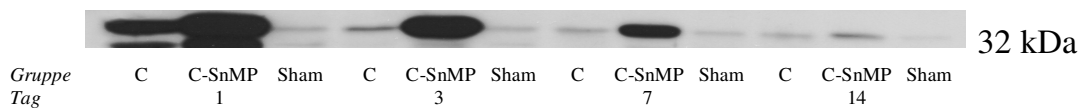


Abb. 5 Repräsentative Westernblot-Analyse der postinterventionellen HO1-Expression in der Nierenrinde für die Gruppen Clamping („C“), Clamping + SnMP („C-SnMP“) und Sham an den Tagen 1, 3, 7 und 14.

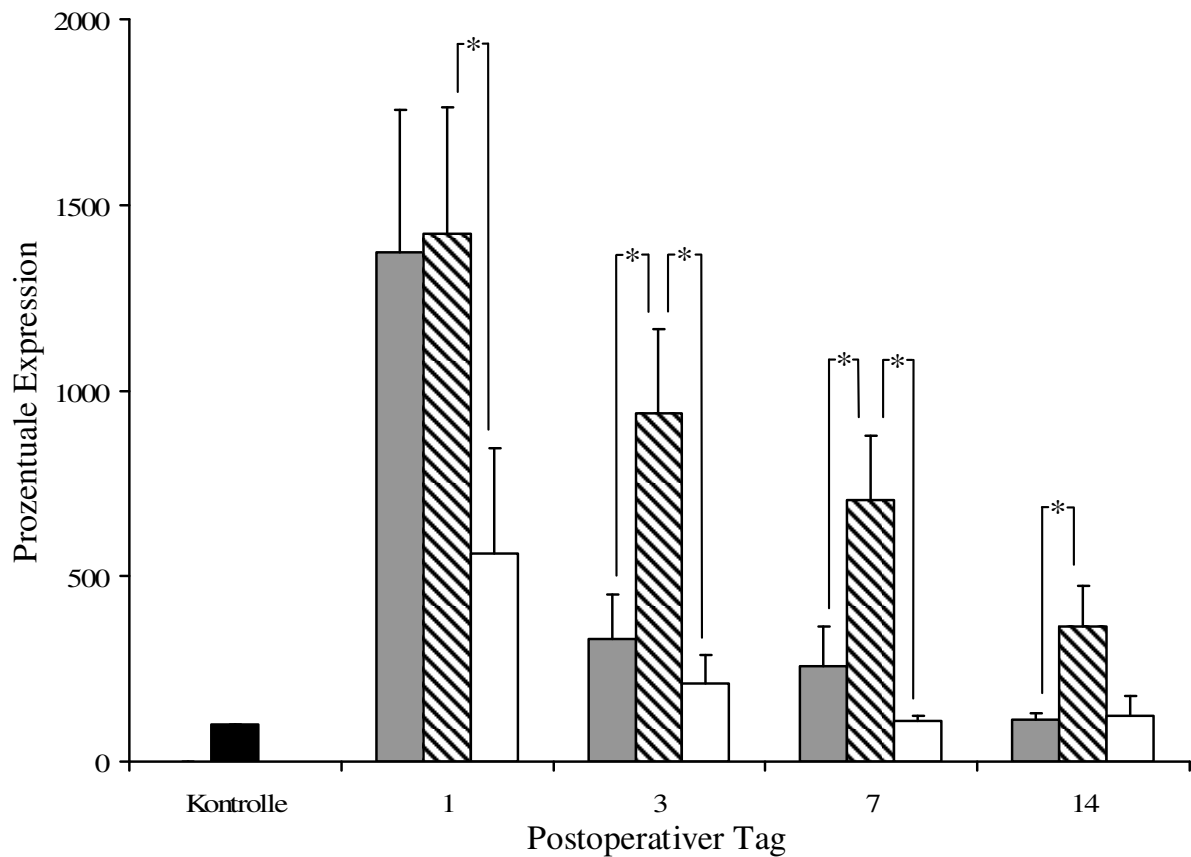


Abb. 6 Enzymexpression der HO1 im renalen Kortex nach akutem ischämischen Nierenversagen. Vergleich von Clamping- (grau), Clamping + SnMP- (schraffiert) und Sham-Gruppe (weiß), jeweils n = 4-6 (* = p < 0,05)

3.2.2 Expression der Hämoxxygenase-1 in der Medulla

Auch im Nierenmark ließ sich eine erhöhte Expression in allen Versuchsgruppen nachweisen, deren Maximalwerte am Tag 1 zu finden waren.

Der höchste Enzymgehalt der Clamping-Gruppe betrug am ersten postinterventionellen Tag 837 ± 210 %, fiel dann aber am Tag 3 bereit auf 392 ± 149 % ab. Am Tag 7 betrug die Expression nur noch 167 ± 56 %, und schließlich am 14. Tag 80 ± 19 % des Ausgangsniveaus Tag 0. Signifikante Unterschiede zu Tag 0 erreichte die Expression an Tag 1 und 3.

Die Clamping + SnMP-Gruppe erreichte einen mit der Clamping-Gruppe vergleichbaren Spitzenwert von 823 ± 105 % am ersten Tag. Wie bereits im Kortex blieb das Maß der HO1-Expression der Clamping + SnMP-Gruppe mit 700 ± 111 % am 3. postinterventionellen Tag und 569 ± 101 % am 7. Tag noch die ganze erste Woche erhöht. Diese drei Werte zeigten einen signifikanten Unterschied zur Kontrollgruppe. Erst zum Ende des Analyseintervalls am Tag 14 waren niedrigere Werte mit 156 ± 45 % vom Ausgangswert festzustellen.

Die Sham-Gruppe erreichte ihr Maximum von 337 ± 202 % am ersten postoperativen Tag mit einem signifikanten Unterschied zu Tag 0 und pendelte sich im weiteren Verlauf wieder auf ein Quantum ein, das sich der Kontrollgruppe anglich, mit 86 ± 13 % am Tag 3, 98 ± 59 % am Tag 7 und 162 ± 123 % zum Versuchsende am Tag 14.

Zwischen der Clamping- und der Clamping + SnMP-Gruppe fand sich am Tag 7 ein signifikanter Unterschied in der HO1-Expression. Gegenüber der Sham-Gruppe zeigte die Clamping + SnMP-Gruppe wie in den kortikalen Proben signifikant höhere Proteinkonzentrationen an den Tagen 1, 3 und 7.

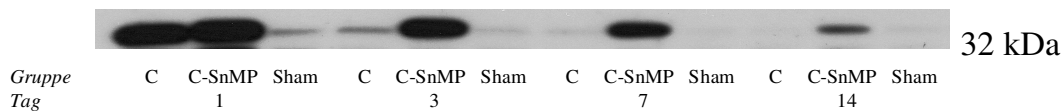


Abb. 7 Repräsentative Westernblot-Analyse der postinterventionellen HO1-Expression im Nierenmark für die Gruppen Clamping („C“), Clamping + SnMP („C-SnMP“) und Sham an den Tagen 1, 3, 7 und 14.

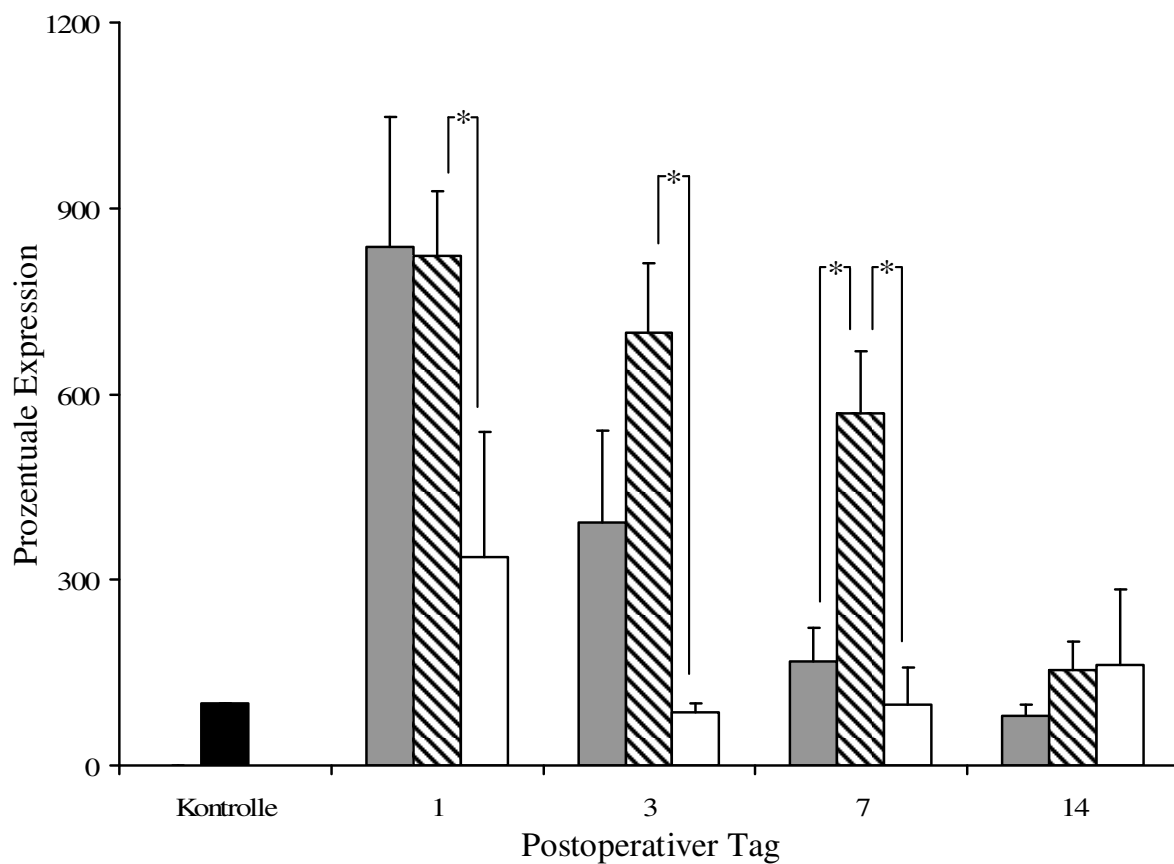


Abb. 8 Enzymexpression der HO1 in der renalen Medulla nach akuten ischämischen Nierenversagen. Vergleich von Clamping- (grau), Clamping + SnMP- (schraffiert) und Sham-Gruppe (weiß), jeweils $n = 4-6$ (* = $p < 0,05$).

3.3 Die Auswirkung von SnMP auf die Expression der Hämoxxygenase-2 im akuten ischämischen Nierenversagen

3.3.1 Expression der Hämoxxygenase-2 im Kortex

Die Expression der konstitutiven Hämoxxygenase-2 (HO2) zeigte im Gegensatz zu der Hochregulierung der induzierbaren HO1 keine deutlichen Veränderungen im Vergleich zur Kontrollgruppe.

In der Clamping-Gruppe fand sich am Tag 1 mit einem Wert von $160 \pm 28 \%$ bereits die maximale Erhöhung der Expression. In weiteren Versuchsverlauf blieben die Werte relativ konstant mit $133 \pm 20 \%$ am dritten postoperativen Tag, $146 \pm 24 \%$ am Tag 7 und $130 \pm 26 \%$ am Tag 14, gemessen am Ausgangsniveau Tag 0.

Auch die Clamping + SnMP-Gruppe zeigte im Vergleich zu Tag 0 nur geringfügige Schwankungen. Am Tag 1 betrug die Expression $112 \pm 32 \%$, am Tag 3 belief sie sich auf $126 \pm 31 \%$, auf $129 \pm 42 \%$ am 7. Tag und am 14. Tag schließlich auf $126 \pm 35 \%$ des Ausgangswerts vom Tag 0.

Die Expression der Sham-Gruppe erreichte am Tag 1 nur einen Wert von $116 \pm 4 \%$, stieg aber im Folgenden auf $138 \pm 14\%$ am 3. Tag und beschrieb ein Maximum von $143 \pm 38 \%$ am 7. Tag. Zum Ende des Versuchs am 14. Tag war der Wert wieder mit $100 \pm 19 \%$ des Ausgangsniveaus nicht signifikant abgrenzbar.

Zusammenfassend zeigt sich die HO2 im Kortex nur schwach reguliert, an Tag ist ein Trend zur Überexpression der Clamping-Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe zu verzeichnen.

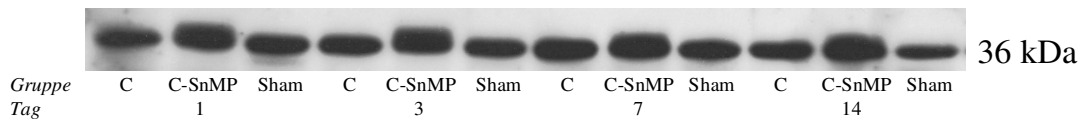


Abb. 9 Repräsentative Westernblot-Analyse der postinterventionellen HO2-Expression in der Nierenrinde für die Gruppen Clamping („C“), Clamping + SnMP („C-SnMP“) und Sham an den Tagen 1, 3, 7 und 14.

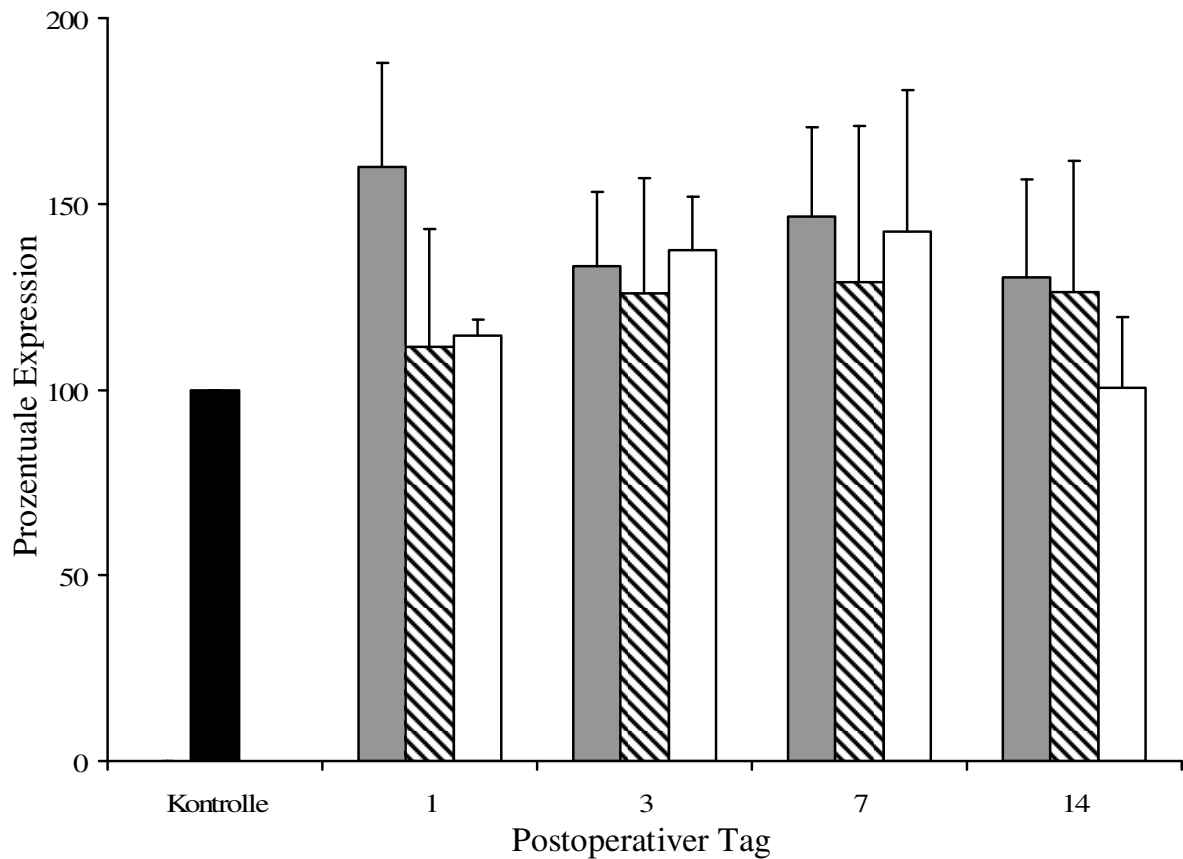


Abb. 10 Enzymexpression der HO2 im renalen Kortex nach akuten ischämischen Nierenversagen. Vergleich von Clamping- (grau), Clamping + SnMP- (schraffiert) und Sham-Gruppe (weiß), jeweils $n = 4-6$ (* = $p < 0,05$).

3.3.2 Expression der Hämoxxygenase-2 in der Medulla

Im Nierenmark zeigte sich gegenüber der Expression in der Nierenrinde ein divergentes Bild.

Die Clamping-Gruppe wies eine stark erhöhte Expression der HO2 von $405 \pm 162 \%$ am ersten postinterventionellen Tag auf. Dies war auch der Maximalwert im Versuchsverlauf, die Werte sanken danach kontinuierlich ab. Am Tag 3 fiel die Überexpression im Vergleich zum Tag 0 auf $287 \pm 121 \%$, am Tag 7 auf $223 \pm 93 \%$ und am Tag 14 betrug er schließlich nur noch $112 \pm 29 \%$.

Im Gegensatz dazu war die Expression in der Clamping + SnMP-Gruppe nur relativ schwach reguliert. Ihr Maximalwert an Tag 1 betrug nur $158 \pm 36 \%$ der Kontrollgruppe vom Tag 0. In den folgenden Versuchstagen war eine verminderte Enzymexpression mit $88 \pm 12 \%$ am Tag 3, $88 \pm 21 \%$ am Tag 7 und $97 \pm 21 \%$ am Tag 14 im Vergleich zum Tag 0 festzustellen.

In der Sham-Gruppe kam es zu einer erhöhten Expression am Tag 1 von $222 \pm 70 \%$ des Ausgangswerts am Tag 0. Dieser Spitzenwert sank am Tag 3 auf $118 \pm 55 \%$. Am 7. postoperativen Tag betrug die Expression $33 \pm 1 \%$ und $75 \pm 39 \%$ des Startniveaus am 14. Tag.

Ein signifikanter Unterschied war zwischen der Clamping + SnMP- und der Sham-Gruppe am Tag 7 festzustellen. Ansonsten zeigte die Clamping-Gruppe an den Tagen 1 und 3 einen Trend zu einer stärkeren Hochregulation der HO2-Expression im Vergleich zur Clamping + SnMP-Gruppe.

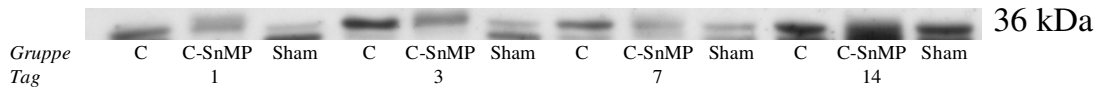


Abb. 11 Repräsentative Westernblot-Analyse der postinterventionellen HO2-Expression im Nierenmark für die Gruppen Clamping („C“), Clamping + SnMP („C-SnMP“) und Sham an den Tagen 1, 3, 7 und 14.

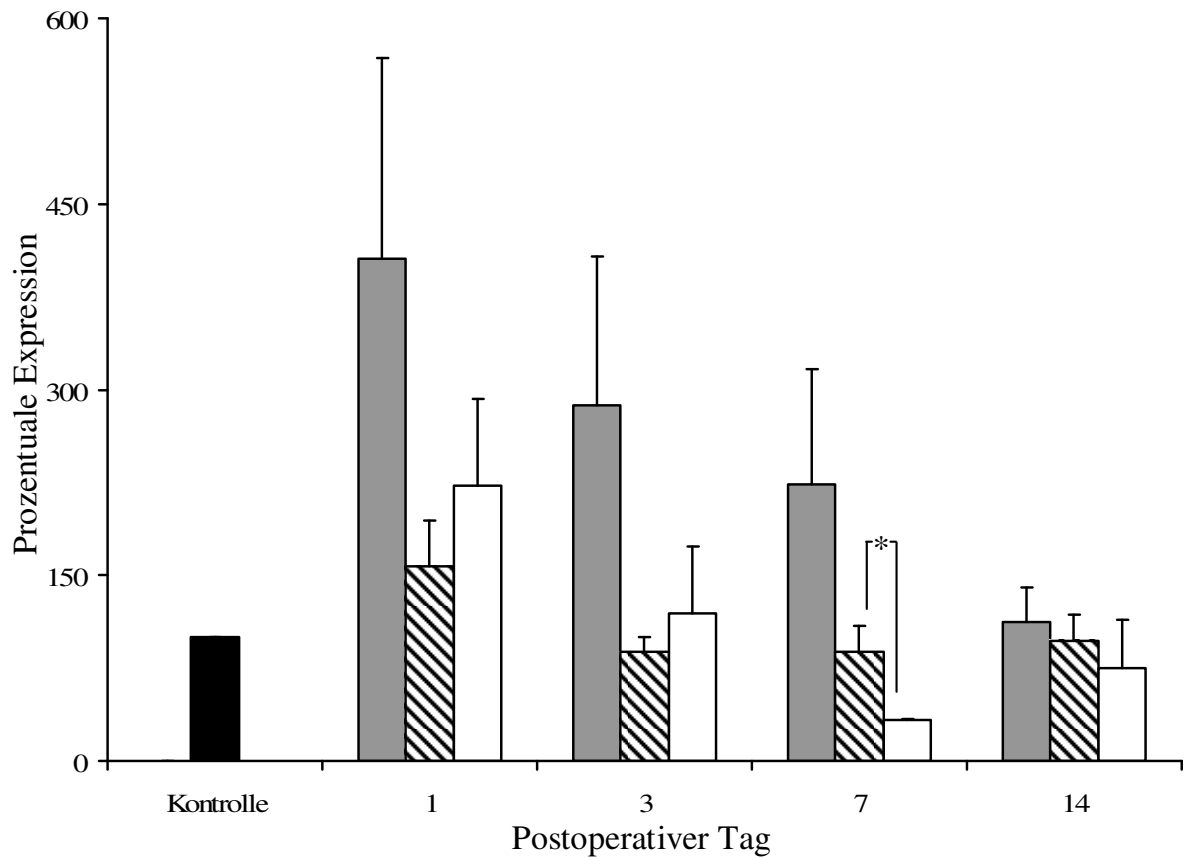


Abb. 12 Enzymexpression der HO2 in der renalen Medulla nach akuten ischämischen Nierenversagen. Vergleich von Clamping- (grau), Clamping + SnMP- (schraffiert) und Sham-Gruppe (weiß), jeweils n = 4-6 (* = p < 0,05).

3.4 Die Auswirkung von SnMP auf die Expression der endothelialen Stickoxidsynthase im akuten ischämischen Nierenversagen

3.4.1 Expression der endothelialen Stickoxidsynthase im Kortex

Bei der Untersuchung der endothelialen Stickoxidsynthase (eNOS) ließen sich in der Nierenrinde erhöhte Proteinmengen feststellen, wobei in allen Gruppen das Maximum am ersten postinterventionellen Tag nachzuweisen war.

Die Clamping-Gruppe stieg mit der Expression am Tag 1 auf $403 \pm 99 \%$ im Vergleich zu Tag 0 mit signifikantem Unterschied an, fiel aber bereits am Tag 3 wieder auf $266 \pm 62 \%$. Im Laufe der ersten Versuchswoche kam es zu keiner weiteren Expressionsminderung, am 7. Tag betrug die Enzymmenge immer noch $267 \pm 65 \%$ des Ausgangsniveaus. Wie auch an Tag 1 war die Expression an den Tagen 3 und 7 im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant erhöht. Erst zum Ende des Versuchsintervalls am Tag 14 wurde ein Rückgang der Expression auf $165 \pm 70 \%$ des Startwerts vom Tag 0 dokumentiert.

In der Clamping + SnMP-Gruppe ließ sich nach einem initialen Anstieg am Tag 1 auf $191 \pm 41 \%$ des Kontrollwerts, von diesem sich der Enzymgehalt signifikant unterschied, ein annähernd linearer Verlauf verfolgen. Am Tag 3 betrug die Expression $156 \pm 55 \%$ und am Tag 7 $126 \pm 31 \%$, während sie am 14. Tag, ausgehend von Tag 0, auf $87 \pm 26 \%$ sank.

Die Regulierung der eNOS in der Sham-Gruppe ähnelte der der Clamping + SnMP-Gruppe, startete aber am ersten postoperativen Tag mit einer stärkeren Überexpression von $236 \pm 18 \%$, die sich als signifikant zu Tag 0 erwies. Bereits in der ersten Woche fiel die Expression im Vergleich zu Tag 0 deutlich auf $120 \pm 90 \%$ am Tag 3 und $86 \pm 60 \%$ am Tag 7 ab. Zum Ende der Versuchsreihe an Tag 14 betrug sie schließlich nur noch $77 \pm 63 \%$ vom Ausgangswert.

Signifikante Unterschiede ließen sich zwischen Clamping- und Clamping + SnMP-Gruppe an Tag 1 und 7 zeigen, mit einer deutlich stärkeren Überexpression am ersten Tag. Am Tag 3 war vergleichsweise zur Clamping + SnMP-Gruppe ein Trend zur ausgeprägteren Hochregulation der Clamping-Gruppe zu beobachten.

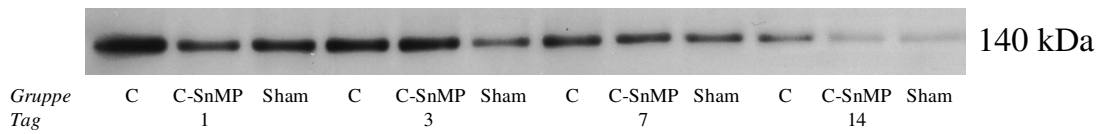


Abb. 13 Repräsentative Westernblot-Analyse der postinterventionellen eNOS-Expression in der Nierenrinde für die Gruppen Clamping („C“), Clamping + SnMP („C-SnMP“) und Sham an den Tagen 1, 3, 7 und 14.

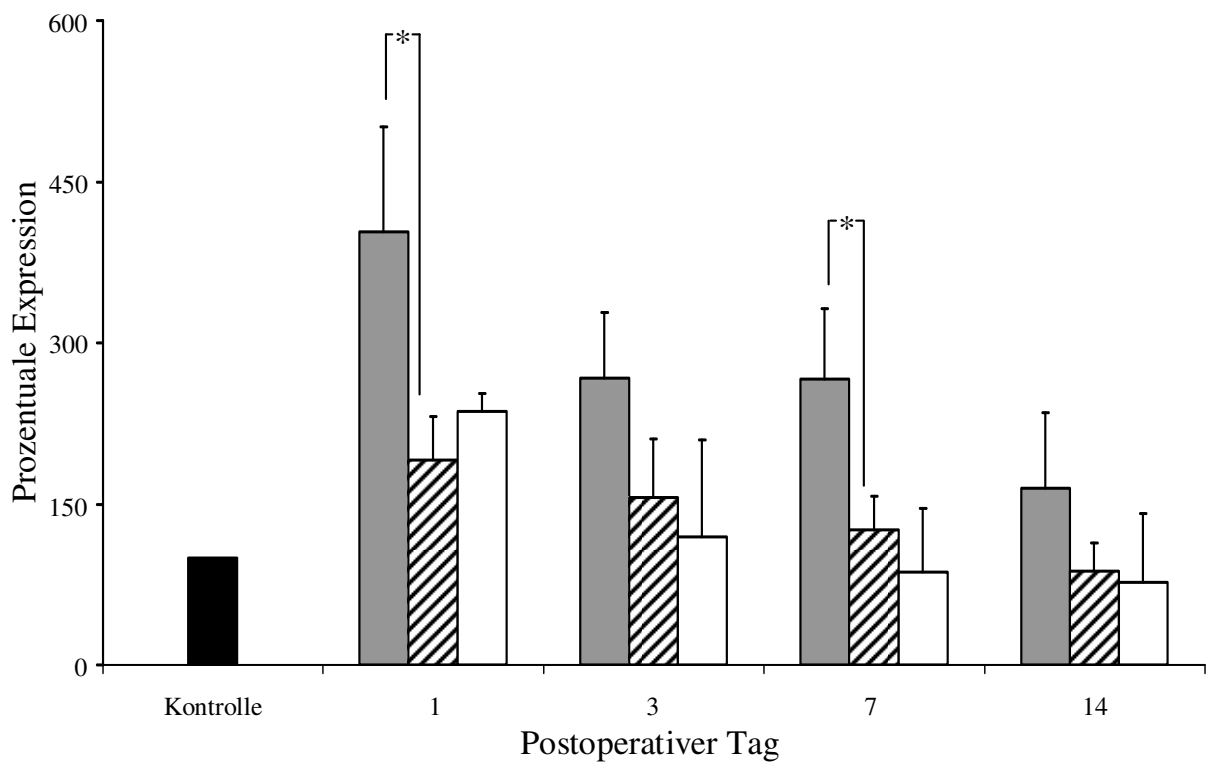


Abb. 14 Enzymexpression der eNOS im renalen Kortex nach akuten ischämischen Nierenversagen. Vergleich von Clamping- (grau), Clamping + SnMP- (schraffiert) und Sham-Gruppe (weiß), jeweils n = 4-6 (* = p < 0,05).

3.4.2 Expression der endothelialen Stickoxidsynthase in der Medulla

Im Nierenmark unterschieden sich die Gruppen insgesamt nur gering und ohne Signifikanz von einander. Die Hochregulierung der eNOS fiel niedriger aus als in der Nierenrinde. Die Maximalwerte wurden im Vergleich zur kortikalen Expression mit einer Latenz erst am dritten postinterventionellen Tag erreicht.

Die Expression der eNOS in der Clamping-Gruppe betrug am 1. Tag $261 \pm 38 \%$ und stieg am 3. postoperativen Tag auf einen Maximalwert von $301 \pm 29 \%$. Diese beiden Werte waren gegenüber Tag 0 signifikant erhöht. Ende der ersten Woche fiel die Expression bereit wieder auf $210 \pm 26 \%$ an Tag 7 und am 14. Tag erreichte sie einen Tiefswert von $83 \pm 19 \%$.

Im Verlauf ähnlich zeigte sich die Clamping + SnMP-Gruppe. Am Tag 1 war eine erhöhte Expression von $179 \pm 40 \%$ nachzuweisen, die sich am Tag 3 noch auf das Maximum von $257 \pm 68 \%$ steigerte und hier signifikant zu Tag 0 erhöht war. Danach kam es zum Absinken der Überexpression auf $170 \pm 45 \%$ am Tag 7 und schließlich $70 \pm 34 \%$ am Tag 14.

Die Sham-Gruppe zeigte im Vergleich zum Kontrollwert am Tag 0 nur geringen Schwankungen der Proteinmengen während der Versuchsreihe. Am Tag 1 betrug die Expression $158 \pm 56 \%$, $127 \pm 27 \%$ am Tag 3, $169 \pm 28 \%$ am Tag 7 und am Tag 14 schließlich $159 \pm 16\%$ des Ausgangsniveaus. Der zum Ende des Analyseintervalls hohe Proteinbestand hob sich signifikant von dem der Clamping + SnMP-Gruppe am Tag 14 ab. Im Vergleich zur kortikalen Enzymsynthese zeigte die Sham-Gruppe in der Medulla eine stärkere Expression der eNOS.

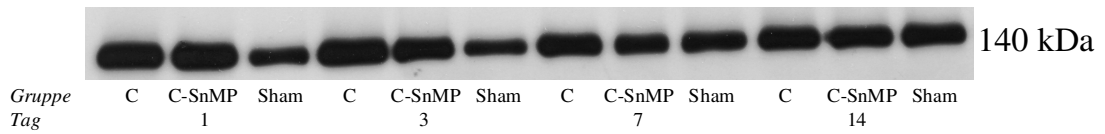


Abb. 15 Repräsentative Westernblot-Analyse der postinterventionellen eNOS-Expression im Nierenmark für die Gruppen Clamping („C“), Clamping + SnMP („C-SnMP“) und Sham an den Tagen 1, 3, 7 und 14.

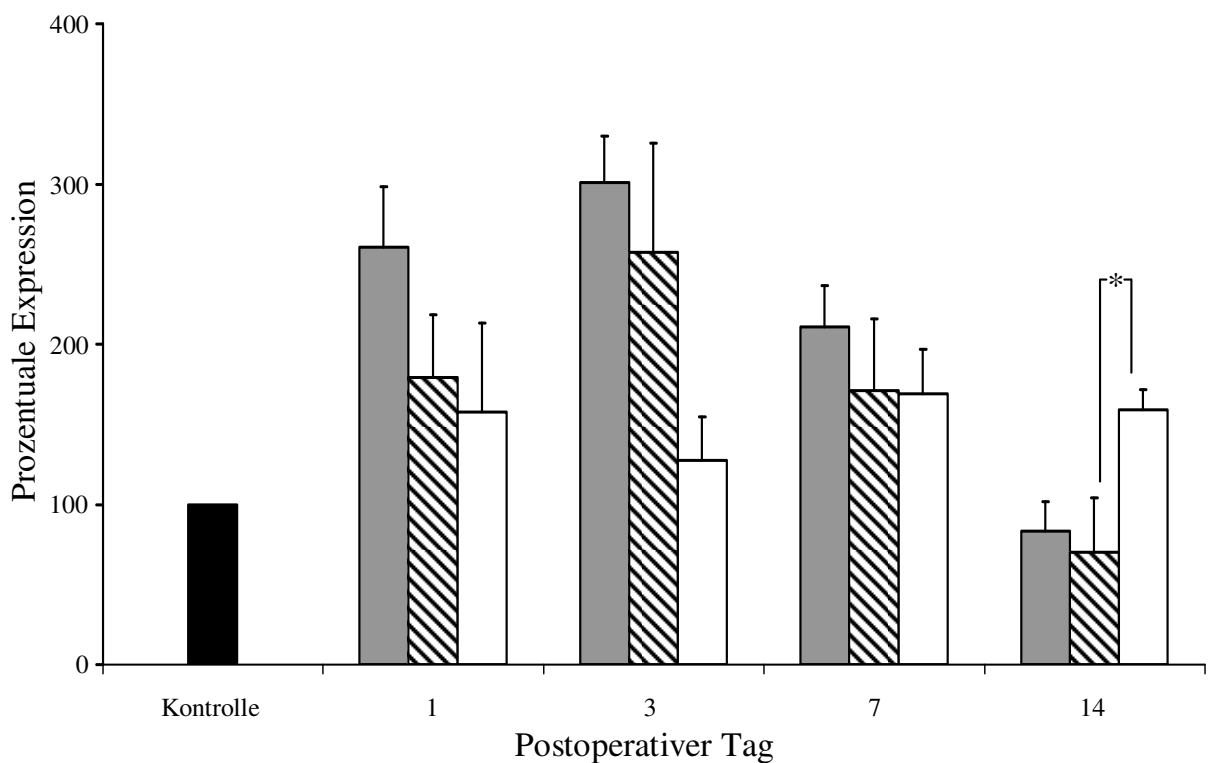


Abb. 16 Enzymexpression der eNOS in der renalen Medulla nach akuten ischämischen Nierenversagen. Vergleich von Clamping- (grau), Clamping + SnMP- (schraffiert) und Sham-Gruppe (weiß), jeweils n = 4-6 (* = p < 0,05).

3.5 Die Auswirkungen von SnMP auf die Expression der löslichen Guanylatzyklase- β im akuten ischämischen Nierenversagen

3.5.1 Expression der löslichen Guanylatzyklase im Kortex

Die lösliche Guanylatzyklase (sGC- β) zeigte sich in diesem Versuchsaufbau nur schwach reguliert. Die Maximalwerte erreichten alle Gruppen erst im Laufe der ersten Woche.

So lag die Expression der Clamping-Gruppe am ersten postoperativen Tag bei 123 ± 25 % und änderte sich bis zum 3. Tag nicht signifikant, an dem ein Wert von 123 ± 14 % des Ausgangswerts vom Tag 0 festgestellt wurde. Erst am Tag 7 erreichte die Expression ein Maximum von 155 ± 15 %. Am 14. Tag lag noch eine Hochregulation von 135 ± 14 %, gemessen am Kontrollwert der Tag-0-Gruppe, vor.

In der Clamping + SnMP-Gruppe zeigte sich ein ähnlicher Verlauf. Während am Tag 1 die Expression der sGC- β mit 94 ± 14 % nicht signifikant unter den Kontrollwerten lag, stieg sie am Tag 3 auf 120 ± 7 % und am Tag 7 auf 141 ± 19 %. Von diesem Höchstwert fiel sie am Tag 14 auf 133 ± 14 % des Ausgangsniveaus.

Die Expression der Sham-Gruppe bewegte sich ohne signifikante Unterschiede tendenziell über den Kontrollwerten. Ausgehend von 111 ± 7 % am Tag 1 erreichte sie ihr Maximum am 3. postinterventionellen Tag mit 123 ± 8 %, lag aber am Tag 7 bereits wieder bei 106 ± 3 % und am Tag 14 schließlich bei 101 ± 1 % des Kontrollwerts vom Tag 0.

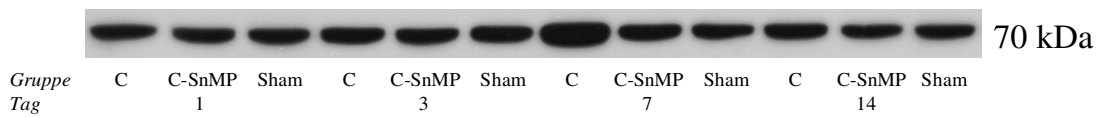


Abb. 17 Repräsentative Westernblot-Analyse der postinterventionellen sGC-β-Expression in der Nierenrinde für die Gruppen Clamping („C“), Clamping + SnMP („C-SnMP“) und Sham an den Tagen 1, 3, 7 und 14.

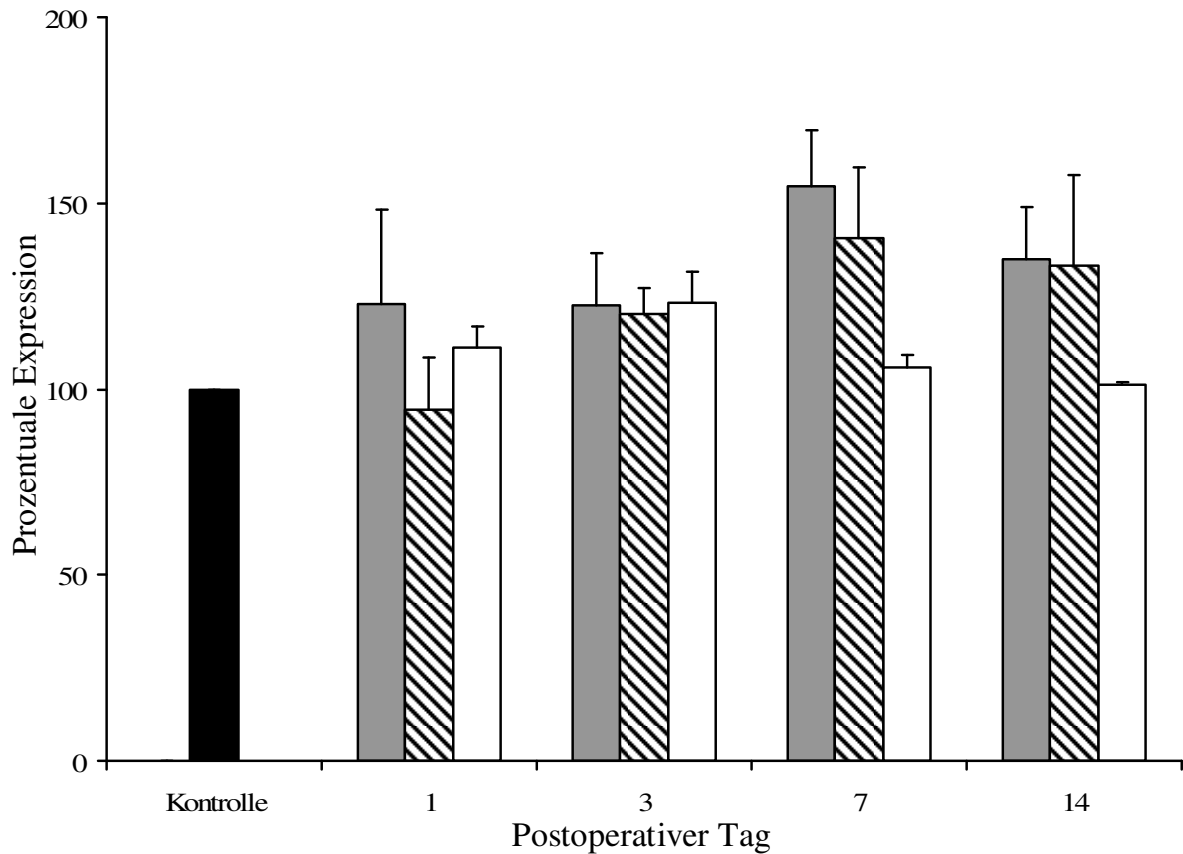


Abb. 18 Enzymexpression der sGC-β im renalen Kortex nach akuten ischämischen Nierenversagen. Vergleich von Clamping- (grau), Clamping + SnMP- (schraffiert) und Sham-Gruppe (weiß), jeweils n = 4-6 (* = p < 0,05).

3.5.2 Expression der löslichen Guanylatzyklase in der Medulla

Ein vergleichbares Bild der sGC- β -Regulation präsentierte sich auch im Nierenmark. Innerhalb der Clamping-Gruppe, die am Tag 1 noch bei $86 \pm 17 \%$ des Kontrollwerts lag, kam es erst im Verlauf der ersten Woche zu einer Hochregulierung der sGC- β -Expression. Am Tag 3 betrug sie $103 \pm 11 \%$ und am Tag 7 ein Maximum von $133 \pm 19 \%$ des Ausgangsniveaus. In der zweiten Woche sanken die Werte auf $118 \pm 13 \%$ am Tag 14.

In der Clamping + SnMP-Gruppe betragen die Werte am 1. Tag $77 \pm 16 \%$ und am 3. Tag $106 \pm 16 \%$. Das an Tag 7 erreichte Maximum war bei $133 \pm 27 \%$ festzustellen. Zum Ende des Versuchsintervalls am Tag 14 zeigte sich mit $101 \pm 11 \%$ eine Angleichung an die Kontrollwerte.

Auch die Sham-Gruppe verhielt sich in der Medulla analog dem im Cortex beschriebenen Verlauf. Ein Höchstwert von $111 \pm 11 \%$ im Vergleich zur Kontrollgruppe wurde bereit am ersten Tag erreicht, danach verringerte sich die Expression geringfügig. Am Tag 3 betrug sie zunächst noch $106 \pm 6 \%$, am Tag 7 nur noch $96 \pm 1 \%$ und am Tag 14 letztlich $90 \pm 3 \%$ des Ausgangswerts.

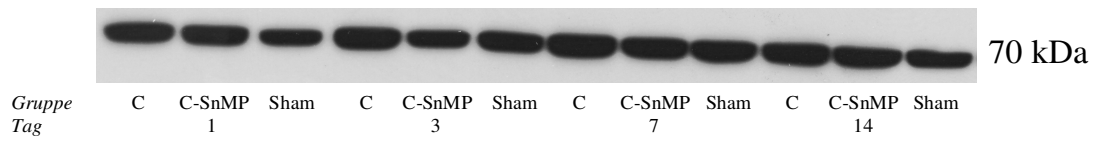


Abb. 19 Repräsentative Westernblot-Analyse der postinterventionellen sGC-β-Expression im Nierenmark für die Gruppen Clamping („C“), Clamping + SnMP („C-SnMP“) und Sham an den Tagen 1, 3, 7 und 14.

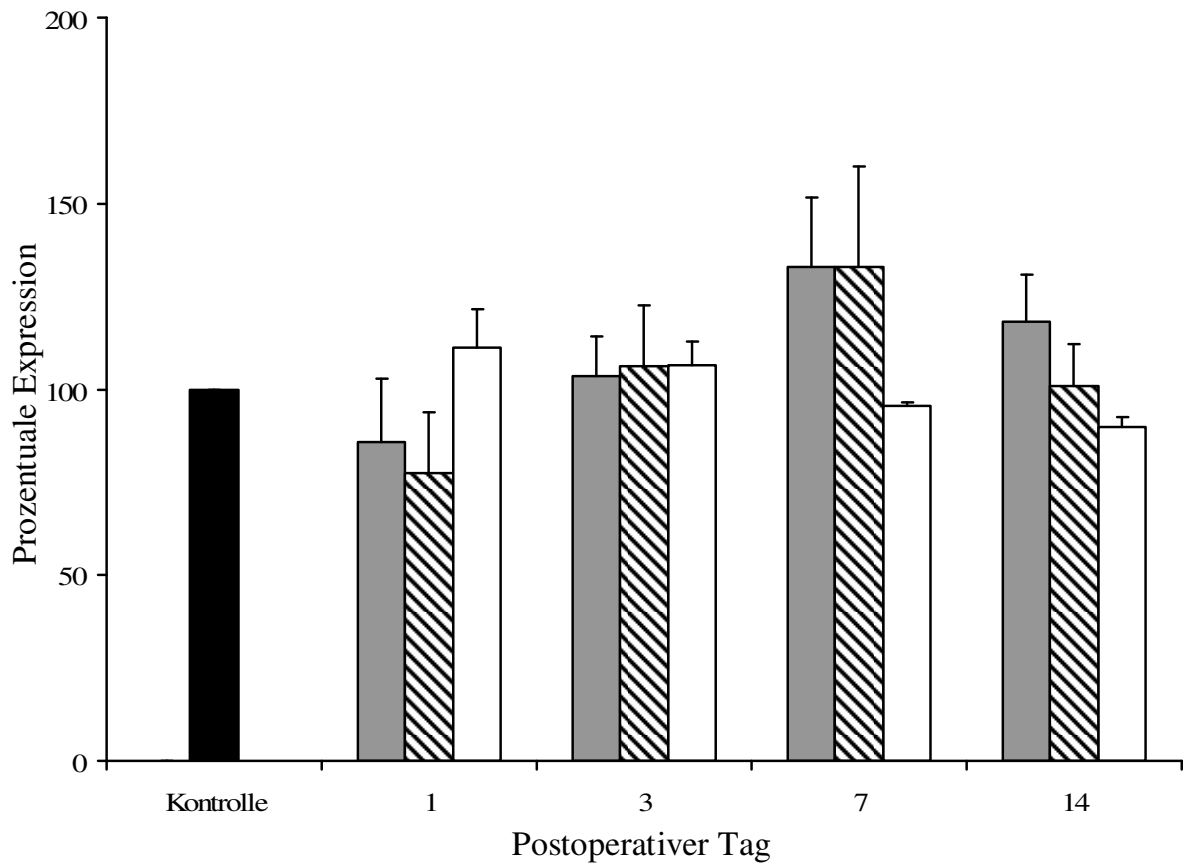


Abb. 20 Enzymexpression der sGC-β in der renalen Medulla nach akuten ischämischen Nierenversagen. Vergleich von Clamping- (grau), Clamping + SnMP- (schraffiert) und Sham-Gruppe (weiß), jeweils n = 4-6 (* = p < 0,05).

3.6 Die Auswirkungen von SnMP auf die Expression der Biliverdinreduktase im akuten ischämischen Nierenversagen

3.6.1 Expression der Biliverdinreduktase im Kortex

In der Nierenrinde ließen sich in der Regulation der Biliverdinreduktase (BVR) nur leichte Veränderungen ohne signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen feststellen.

In der Clamping-Gruppe ergab sich am Tag 1 im Vergleich zur Kontrollgruppe ein erhöhter Proteingehalt von $122 \pm 24 \%$ und am Tag 3 dann ein Höchstwert von $156 \pm 53 \%$. Im weiteren Verlauf sanken die Expressionswerte auf $130 \pm 25 \%$ am Tag 7 und am 14. Tag auf $122 \pm 18 \%$ des Ausgangsniveaus.

Die Clamping + SnMP-Gruppe zeigte über den gesamten Versuchszeitraum, gemessen an den Kontrollwerten, keine signifikante Veränderung. Das bereits am Tag 1 erreichte Maximum lag bei $109 \pm 17 \%$ des Ausgangswerts. Am Tag 3 betrug die Expression $107 \pm 7 \%$, Ende der ersten Woche verminderte sie sich auf $83 \pm 12 \%$ am Tag 7 und am Tag 14 wurden $98 \pm 7 \%$ in Vergleich zum Tag 0 gemessen.

Ein ähnlicher Verlauf zeigte sich in der Sham-Gruppe. Ihr Initialwert am Tag 1 lag bei $124 \pm 3 \%$ und veränderte sich bis Tag 3 mit $125 \pm 5 \%$ nicht weiter. Am Tag 7 belief sich die Expression auf $96 \pm 9 \%$ und am Tag 14 auf $102 \pm 5 \%$ des Kontrollwerts.

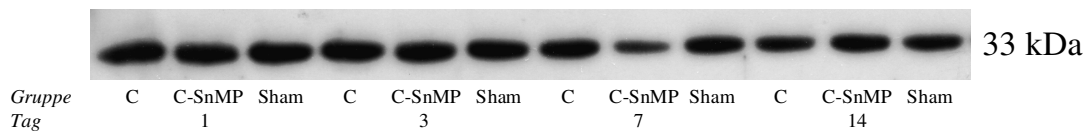


Abb. 21 Repräsentative Westernblot-Analyse der postinterventionellen BVR - Expression in der Nierenrinde für die Gruppen Clamping („C“), Clamping + SnMP („C-SnMP“) und Sham an den Tagen 1, 3, 7 und 14.

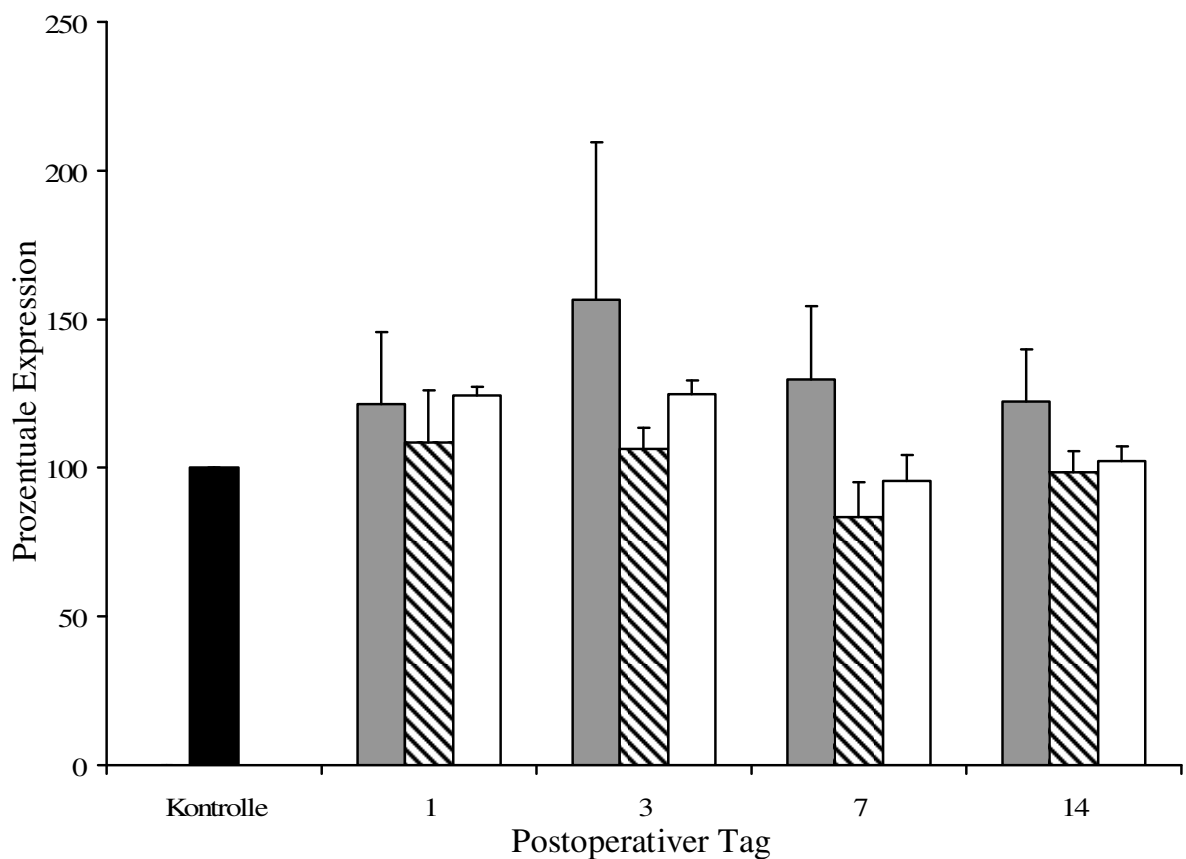


Abb. 22 Enzymexpression der BVR im renalen Kortex nach akuten ischämischen Nierenversagen. Vergleich von Clamping- (grau), Clamping + SnMP- (schraffiert) und Sham-Gruppe (weiß), jeweils n = 4-6 (* = p < 0,05).

3.6.2 Expression der Biliverdinreduktase in der Medulla

Im Vergleich zum Cortex war die Expression der BVR im Nierenmark größeren Regulationsänderungen unterworfen.

Der Initialwert der Clamping-Gruppe am Tag 1 betrug $160 \pm 60 \%$ des Ausgangswerts und stellte mit signifikantem Unterschied zu Tag 0 gleichzeitig den Maximalwert im Versuchsverlauf dar. Am Tag 3 ließen sich $150 \pm 22 \%$ nachweisen und am Tag 7 $116 \pm 25 \%$. Tag 14 brachte einen wieder gestiegenen Prozentsatz von $141 \pm 23 \%$ im Vergleich zum Kontrollwert.

Die Clamping + SnMP-Gruppe bewegte sich ähnlich wie im Kortex nahe der Expression am Tag 0. Am 1. Tag wurden $102 \pm 17 \%$, am 3. Tag $85 \pm 10 \%$ und am 7. Tag $88 \pm 15 \%$ des Ausgangsniveaus gemessen. Zum Ende des Versuchszeitraums am Tag 14 lag die Expression bei $120 \pm 14 \%$ im Vergleich zu Tag 0.

In der Sham-Gruppe war am Tag 1 ein zu Tag 0 signifikant abgrenzbarer Höchstwert von $192 \pm 29 \%$ festzustellen, danach sank die Expression über $168 \pm 50 \%$ am Tag 3 bis auf $65 \pm 37 \%$ am Tag 7. Am Tag 14 zeigte sich mit $95 \pm 11\%$ wieder ein den Kontrollwerten angeglicherer Prozentsatz.

Bei der Clamping-Gruppe ließ sich an den Tagen 1 und 3 eine signifikant stärkere Überexpression der BVR beobachten als bei der Clamping + SnMP-Gruppe. Diese war auch im Vergleich zur Sham-Gruppe am 1. Tag signifikant schwächer reguliert und zeigte auch am 3. Tag den Trend zu diesem Phänomen.

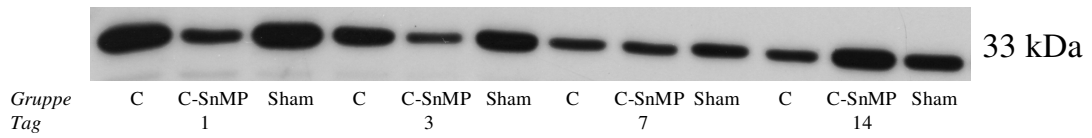


Abb. 23 Repräsentative Westernblot-Analyse der postinterventionellen BVR-Expression im Nierenmark für die Gruppen Clamping („C“), Clamping + SnMP („C-SnMP“) und Sham an den Tagen 1, 3, 7 und 14.

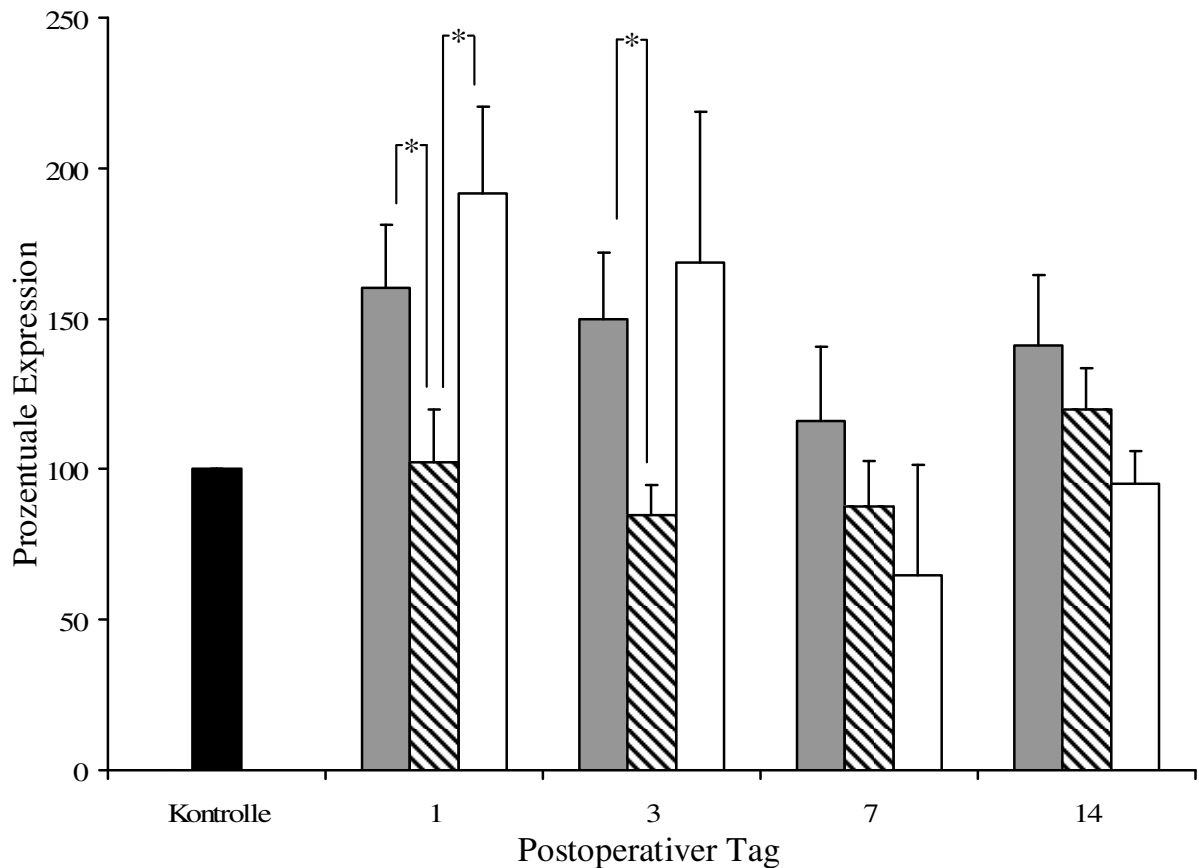


Abb. 24 Enzymexpression der BVR in der renalen Medulla nach akuten ischämischen Nierenversagen. Vergleich von Clamping- (grau), Clamping + SnMP- (schraffiert) und Sham-Gruppe (weiß), jeweils n = 4-6 (* = p < 0,05).

3.7 Zusammenfassung der Ergebnisse

Im Rahmen des Versuchs zeigte sich, dass ein ischämisches akutes Nierenversagen, das an Ratten durch Clamping beider Nierenarterien induziert wurde, zu einem initial starken Abfall der renalen Funktionsparameter mit stetiger Erholung im Verlauf des 14-tägigen Follow-up führt. Der Nachweis wurde durch Bestimmung von Inulin- und PAH-Clearance erbracht. Versuchstiere, die perioperativ mit dem Hämoxygenase-Inhibitor Zinn(VI)-Mesoporphyrin behandelt wurden, reagierten auf die Ischämie mit einem stärkeren Abfall der Nierenfunktionsparameter mit signifikant niedrigeren Werten direkt am ersten postoperativen Tag. Danach ließ sich ein Trend zu einer deutlichen Erholung in dieser Behandlungsgruppe erkennen, bis sich die Werte in der zweiten Woche der Kurve der Clamping-Gruppe angleichen.

Bezüglich der Expression der Schlüsselenzyme HO, NOS, sGC und BVR im akuten ischämischen Nierenversagens ließen sich folgende Beobachtungen machen: Während die Expression der induzierbaren HO-1 stark anstieg, zeigte die konstitutive HO in diesem Zusammenhang erwartungsgemäß eine geringere Regulation. Dies bestätigt die Annahme, dass HO-1 als Akut-Phase-Protein im ischämischen ANV eine bedeutende Rolle spielt. Unter der Behandlung mit dem HO-1 Inhibitor zeigte sich insgesamt eine Überexpression über den gesamten Versuchszeitraum. Dies festigt die Beobachtung, dass SnMP zwar die Aktivität der HO-1 zu hemmen scheint, konsekutiv aber die Expression erhöht.

Desweiteren zeigten die höheren eNOS-Proteinkonzentrationen als Antwort auf die Ischämie die Dysregulation des NOS-NO-Systems an. Unter der Hemmung der HO-1 fiel die Hochregulation der eNOS insbesondere kortikal schwächer aus. Das gemeinsame Zielenzym von NO und CO, die sGC, zeigte einen Trend zur erhöhten Expression in allen Gruppen, mit geringfügig niedrigeren Werten bei den Tieren, die mit SnMP behandelt wurden.

Die Expression der BVR zeigte insbesondere medulläre Veränderungen, die sich bei der Clamping-Gruppe in höheren Proteinkonzentrationen darstellten, während bei der Behandlung mit SnMP keine Veränderung zur Kontrollgruppe festzustellen war.

4 Diskussion

Diese Arbeit befasst sich mit den Auswirkungen des akuten ischämischen Nierenversagens auf die renale Filtrations- und Exkretionsfunktion mit besonderem Augenmerk auf die Beteiligung des CO/NO-Systems im Tiermodell der Ratte.

Die Folge einer renalen Ischämie ist die Einschränkung der Nierenfunktion, verbunden mit strukturellen Schäden und Bildung zytotoxischer Stoffe. Kernpunkte des Pathomechanismus sind die Drosselung der Nierendurchblutung¹³ und inflammatorische Prozesse^{7,21}. Zuerst betroffen sind die Zellen der proximalen Tubuli, da diese Zone bereits unter physiologischen Bedingungen eine geringe Sauerstoffsättigung aufweist und im Falle einer Ischämie als vulnerabelste Struktur hypoxisch geschädigt wird. Der Sauerstoffmangel führt hierbei zur Beeinträchtigung der mitochondrialen Atmungskette und letztlich zur ATP-Depletion¹⁶. Der Verlust dieses wichtigen Energieträgers initiiert eine komplexe Kaskade, die in der Apoptose und Nekrose der Tubuluszellen und damit einer Schwächung der Barriere zwischen Interstitium und Lumen gipfelt. Folgen dieser strukturellen Veränderungen sind der Rückstrom des Harns ins Interstitium, die tubuläre Obstruktion und das Versagen der Filtrationsfunktion^{14,19}. Bedeutend in der Progressionsphase des ANVs ist die Entstehung einer endothelialen Dysfunktion, wodurch das Endothel seine Aufgaben in der Stabilisierungsphase im Sinne der Interaktionskoordinierung von Endothel und inflammatorischen Zellen^{14,152}, sowie der Steuerung von Tonus, Perfusion und Permeabilität der Gefäße²⁰ und der endothelabhängigen Regulierung der Gerinnungskaskade¹⁵³, nicht mehr erfüllen kann. Es wird vermutet, dass auf diese endotheliale Dysfunktion die in der Rinden-Mark-Grenze zu beobachtenden Veränderungen, wie Gefäßstauung und Ödembildung, sowie ein verminderter Blutfluss und die Infiltration inflammatorischer Zellen, zurückzuführen sind²⁰.

Im Verlauf der Bemühungen, die pathophysiologischen Zusammenhänge des ANVs zu beleuchten, wurden einige Enzyme und ihre Produkte als wichtige Faktoren, sowohl der Schutz-, als auch der Pathomechanismen, identifiziert. Die induzierbare Hämoxxygenase (HO-1) gilt als Akute-Phase-Protein, das die Zellen im Falle überschießender Produktion reaktiver Sauerstoffspezies zu schützen scheint. Ein beteiligter Mechanismus ist der des Abbau freien Häms, welches aus oxidiertem Hämoglobin an

das Endothel abgegeben werden kann¹⁵⁴. Die Gefahr des freien Häms liegt in seinem hydrophoben Charakter, wodurch das Molekül Zellmembranen passieren kann und sich im hydrophoben Milieu anreichert. Kumuliert es in den Zellen, kann es entweder direkt oxidativen Schaden verursachen, oder indirekt durch die Freisetzung von katalytisch hochaktivem Eisen^{57,155}. Ein weiterer Schutzeffekt entsteht durch die im Hämabbau entstehenden Produkte der HO-1, Biliverdin/Bilirubin und CO. Biliverdin bildet mit der Biliverdinreduktase und dessen Produkt Bilirubin einen Redoxzyklus, der diesen Stoff zu einem hochpotenten Antioxidanz werden lässt⁹³. CO dient durch die Aktivierung der sGC und kalziumabhängiger Kaliumkanäle als Vasodilatator⁷⁵ und wirkt zudem über die MAPK-Signalwege antiinflammatorisch^{3,88,89}. Um diese Mechanismen ausführlicher zu analysieren, befasst sich diese Arbeit speziell mit den Auswirkungen einer Hemmung der HO-1 mittels Applikation von SnMP. Das durch die HO-1 entstehende CO beeinflusst außerdem konzentrationsabhängig die Wirkung von NO auf das gemeinsame Zielprotein sGC⁹⁸, so dass der Einfluss einer HO-1 Hemmung auf die Expression der endothelialen NOS, die in der Regulation der Nierenfunktion ebenfalls eine wichtige Rolle einnimmt, ebenfalls analysiert wurde.

Diese Arbeit untersucht, wie sich die Nierenfunktionswerte Inulin- und PAH-Clearance in einem 14-tägigen Versuchszeitraum nach akutem ischämischen Nierenversagen verhalten, welches durch beidseitiges Clamping der Nierenarterien induziert wird. Um die Auswirkungen der SnMP-Anwendung auf die Enzymexpression zu verfolgen, wurde mittels Westernblot der Proteingehalt der Schlüsselenzyme aus dem NO/CO-Stoffwechsel quantitativ bestimmt.

4.1 Methodik und Auswertung

Zur Induktion eines akuten ischämischen Nierenversagens gilt das beidseitige Clamping der Nierenarterien als etablierte Methode. Der untersuchte Wirkstoff konnte perioperativ durch intraperitoneale Verabreichung definiert zugegeben werden. Durch die gute Reproduzierbarkeit im Rahmen der gewählten Methodik konnte die Messgenauigkeit gewährleistet werden.

Jedes Tier wurde in gleicher Art und Weise der Operation und dem Messverfahren unterzogen. Narkotisierung, Ablauf der Intervention und die Tierhaltung vor und nach

der Operation wurden entsprechend genau festgelegter Vorgaben durchgeführt. Bei Auftreten von perioperativen Komplikationen oder interventionellen Auffälligkeiten wurde das betroffene Tier aus der Versuchsreihe genommen. Die Aufarbeitung der Gewebeproben hielt sich streng an einen vorgegebenen Standard, um Fehlerquellen bei der Proteinbestimmung möglichst gering zu halten. Die im Folgenden durchgeführten Westernblots stellen etablierte immunohistochemische Verfahren dar.

4.2 Die Funktionsparameter

Die protektive Rolle der HO-1 im akuten ischämischen Nierenversagen wurde bereits in früheren Arbeiten beschrieben. Dabei zeigte sich, dass eine Induktion der HO-1 mit einer Verbesserung der Nierenfunktion einherging, die Hemmung der HO-1 aber eine ausgeprägt stärkere Schädigung des Nierenparenchyms hervorrief, was sich auch in den Funktionsparametern widerspiegelte⁴⁵.

Im Rahmen des hier durchgeführten Versuchs ließen sich für die Clamping-Gruppe am ersten postinterventionellen Tag die niedrigsten Werte ermitteln, sowohl bei der Bestimmung der Inulin-Clearance wie auch der PAH-Clearance. Im folgenden Verlauf erholte sich die Nierenexkretion wieder mit einem linearen Ansteigen der Funktionsparameter. Die gemessenen Werte spiegeln den klassischen Verlauf des ANV, mit der stärksten funktionellen Beeinträchtigung direkt nach der Schädigung und einer stetigen Verbesserung in der Erholungsphase, wieder.

Die Clamping + SnMP-Gruppe zeigte ebenfalls am ersten Tag nach der Operation die stärkste Reduktion von Inulin- und PAH-Clearance, allerdings weit ausgeprägter als die untherapierte Clamping-Gruppe. Akagi et al.⁴⁵ veröffentlichte in einem Review von 2002 Ergebnisse, die diese Beobachtung untermauern. Hier wurde die Nierenfunktion anstelle von Inulin- und PAH-Clearance mittels des Serumkreatinins bewertet, wobei die mit SnMP behandelten Tiere 24 Stunden nach Induktion eines ischämischen ANV im Vergleich zur unbehandelten Gruppe deutlich erhöhte Serumkreatininwerte zeigten⁴⁵. Verantwortlich für dieses Phänomen scheint die fehlende Schutzfunktion der HO-1 zu sein, da diese durch das falsche Substrat SnMP im aktiven Zentrum kompetitiv gehemmt wird und somit die Spaltung des Hämrings nicht mehr katalysieren kann¹⁴.

Da das Analyseintervall dieses Versuchsaufbaus jedoch nur 24 Stunden betrug, lassen sich keine Vergleiche zum weiteren postoperativen Verlauf in dieser Arbeit ziehen.

Am dritten postinterventionellen Tag zeigte der Kurvenverlauf von Inulin- und PAH-Clearance in der Clamping + SnMP-Gruppe einen steileren Anstieg als in der Clamping-Gruppe und erreichte bessere Funktionswerte der Clearance. Das Defizit des ersten Tages war somit am Tag 3 wieder kompensiert. Um dies zu erklären, muss nochmals auf die Wirkung des SnMP eingegangen werden. Dieses hemmt die HO-1 zwar in ihrer Aktivität, führt aber im Gegenzug auch zu einer gesteigerten Genexpression des Enzyms. Diese Beobachtung machten Da Silva et al.⁴⁴ bei der Untersuchung der Expression und Verteilung der HO-Isoformen in der Rattenniere. Hierbei wurde eine Beeinflussung der Expression durch Applikation von antisense-Oligodeoxynukleotiden, Zinn-Chlorid (SnCl_2), Häm oder SnMP herbeigeführt. Die auf eine Überexpression von HO folgende Depletion des Hämoproteins Cytochrom P450 (CYP450) und der damit verbundenen Konzentrationsabfall des CYP450-abhängigen Eicosanoids 20-Hydroxyeicosatetraensäure diente der Bestimmung der HO-Aktivität, ebenso wurde das HO-Produkts Bilirubin quantitativ bestimmt. Allerdings war die Grundlage dieses Versuchs ein Tiermodell unter physiologischen Bedingungen, bei den Versuchstieren wurden also kein ANV induziert. Des Weiteren wurde ein kürzeres Analyseintervall von 24 Stunden gewählt. Dennoch können die unter physiologischen Bedingungen erhobenen Ergebnisse dazu beitragen, die Beobachtungen bezüglich der Nierenfunktionsparameter im Versuchsmodell des ischämischen ANVs zu verstehen.

Die am dritten Tag gemessenen Clearancewerte könnten sich somit auf den Umstand zurückführen lassen, dass die persistente HO-1-Hemmung aufgrund der fortlaufenden SnMP-Applikation durch die resultierende Überexpression der HO-1 kompensiert wurde, und sich so positiv auf die Verbesserung der Clearance auswirkte.

Ein möglicher Erklärungsansatz für die Expressionssteigerung wäre ein bedarfsorientierter Feedbackmechanismus als Antwort auf die Hemmung der HO-1-Enzymaktivität durch SnMP. Da die HO-1 als protektiver Faktor im ANV eine große Rolle spielt, könnte so die raschere Erholung in der Clamping + SnMP-Gruppe erklärt werden.

Zu Ende der ersten Versuchswoche und im Verlauf der zweiten Woche glichen sich die Kurven von Inulin- und PAH-Clearance der Clamping- und der Clamping + SnMP-Gruppe aneinander an.

Bei der Inulin-Clearance konnte am siebten und vierzehnten Tag keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Gruppen mehr festgestellt werden. Hierbei ist zu bemerken, dass obwohl die SnMP-Gabe nur während der postulierten Akut-Phase und somit letztmals am 5. postinterventionellen Tag verabreicht wurde, noch immer eine SnMP-bedingte HO-1 Überexpression am 7. Tag nach Intervention sowohl medullär als auch kortikal vorlag. Möglich wäre, dass sich der positive regenerative Effekt der vermehrten HO-1 Induktion in der Clamping + SnMP-Gruppe bereits erschöpft hat, so dass keine weitere Verbesserung der Inulin-Clearance erzielbar war. Ebenso könnte die initiale SnMP-bedingte Schädigungszunahme nur noch eine maximale Regeneration analog der nicht additiv SnMP-geschädigten Clamping-Gruppe ermöglichen. Bezüglich der Pharmakokinetik von SnMP wird eine Halbwertszeit von 3-4 Stunden beim Menschen beschrieben¹⁵⁶, es existieren aber Tiermodelle mit einer Halbwertszeit von 9 Monaten. Für das weniger potente Zinn-Protoporphyrin (SnPP) ist eine Halbwertszeit von 3,4 Stunden beschrieben, während die Hemmung der HO bis zu 4 Tage anhält¹⁵⁷. Es ist also durchaus möglich, dass SnMP in der zweiten Hälfte des Analyseintervalls bereits keine Wirkung mehr zeigt.

In der PAH-Clearance zeigte sich für die Tage 7 und 14 in der Clamping + SnMP-Gruppe eine leichte Erniedrigung gegenüber der Clamping-Gruppe, ohne dass jedoch signifikante Unterschiede festzustellen waren. Analog der Inulin-Clearance zeigt sich auch hier eine mit der Stärke des ANVs korrelierende, ausgeprägtere funktionelle und strukturelle Schädigung. Somit scheint auch bei der PAH-Clearance das initial stärker geschädigte Tubulusepithel der Clamping + SnMP-Gruppe in der Regeneration hinter den unbehandelten Tieren zurückbleiben.

Bei der Sham-Gruppe ließ sich erwartungsgemäß keine deutlich signifikante Funktionseinschränkung im Vergleich zum Tag 0 feststellen.

4.3 Die Expressionswerte

4.3.1 Hämoxygenase-1 und Hämoxygenase-2

Die verstärkte Expression der induzierbaren Hämoxygenase ist in vielen Szenarien ein bedeutender Schutzmechanismus, so auch im akuten ischämischen Nierenversagen. Durch den Abbau des Prooxidans Häm und durch die modulierenden Eigenschaften der daraus entstehenden Produkte CO und Biliverdin wirkt eine Hochregulation der HO-1 oxidativen und inflammatorischen Pathomechanismen entgegen. So sind unter erhöhter HO-1-Expression im ischämischen ANV eine deutlich schnellere Erholung der Funktionsparameter und histologisch geringer ausgeprägte Zellschäden, im Sinne des Verlusts von Bürstensaum und Zell-Zell-Kontakten bis hin zur Nekrose und Apoptose der Endothelzellen im vulnerablen Bereich der proximalen Tubuli, beschrieben⁴⁵. Allerdings wird auch das prooxidante Eisenmolekül aus Häm freigesetzt. Die Steigerung der HO-1-Expression ist an eine Induktion von Ferritin gekoppelt³⁷, sodass das Ferritin die Zellen durch Bindung des prooxidativen freien Eisens schützen kann. Dennoch kann eine Überexpression der HO-1, primär durch Akkumulation von freiem Eisen, zu endothelialen Zellschäden führen^{14,24,72}. Diese Beobachtung weist darauf hin, dass die protektiven Eigenschaften der HO-1 primär auf die Wirkung ihrer Produkte Biliverdin/Bilirubin und CO zurückzuführen sein sollte, welche bezüglich ihrer therapeutischer Anwendbarkeit zunehmend ins Blickfeld des wissenschaftlichen Interesses rücken⁹⁸.

Auf immunhistochemischer Ebene bestätigen die Messungen der Nierenfunktion die publizierten Ergebnisse und Schlussfolgerungen. Das Akute-Phase-Protein HO-1 wird nach der Intervention in der Clamping-Gruppe stark hochreguliert. Man kann einen maximalen Proteingehalt bereits am ersten postoperativen Tag feststellen. Jedoch ist diese HO-1-Induktion nur von kurzer Dauer, denn bereits am dritten Tag ist trotz noch fortgesetzter SnMP-Applikation ein Abfall der HO-1-Expression feststellbar. Die Clamping + SnMP-Gruppe zeigt am ersten postinterventionellen Tag eine ebenso deutliche Hochregulierung der HO-1. Die starke Überexpression der HO-1 in dieser frühen postischämischen Phase wird u. a. damit erklärt, dass im Rahmen der Reperfusion reaktive Sauerstoffspezies gebildet werden, was als Folge der Hämfreisetzung

aus dem mikrosomalen Cytochrom P450 beschrieben wurde und einen Induktor der HO-1 darstellt¹⁵⁸. Die Beobachtung, dass die Nierenfunktion der SnMP-behandelten Tiere im Vergleich zur Clamping-Gruppe trotz ebenso starker Hochregulierung der HO-1 schlechter im Bezug auf die Clearance-Leistungen ist, könnte auf den dualen Effekt des SnMPs zurückzuführen sein, da es primär die Aktivität der HO-1 funktionell hemmt, obwohl eine Expressionszunahme indiziert wird. Hierbei könnte es auch durch die Anreicherung mikrosomalen Häms zu einer Verschlechterung der Nierenfunktion kommen. Die prolongierte HO-1 Überexpression in der Clamping + SnMP-Gruppe ist erst im weiteren Versuchsverlauf zu sehen, wenn die HO-1-Expression im Vergleich zur Clamping-Gruppe hoch exprimiert bleibt und deutlich verzögert abfällt. Die Vermutung, dass dies primär auf die SnMP-vermittelte Expressionsinduktion zurückzuführen sein kann, wird durch den im Vergleich deutlich signifikant niedrigeren HO-1 Proteingehalt in der Clamping- und der Sham-Gruppe an den Tagen 3, 7 und 14 unterstützt. Bezüglich der Expression der HO-1 lässt sich eine vergleichbare Kinetik sowohl in Kortex, als auch Medulla der Niere beobachten.

Die HO-2 stellt die konstitutive Isoform dar und übernimmt unter physiologischen Bedingungen die Basalaktivität des Häm-Abbaus. Sie wird immunhistochemisch v. a. im dicken aufsteigenden Teil der Henle-Schleife und den präglomerulären Arteriolen lokalisiert. Sie reagiert bezüglich der Enzymaktivität nicht auf Induktoren der HO-1, scheint aber in Folge erhöhter Hämkonzentrationen mit einer geringfügigen Steigerung der Expression zu antworten. Es wurde außerdem bereits gezeigt, dass SnMP die Enzymaktivität der HO-2 senkt und ihre Proteinkonzentration verringert⁴⁴.

In unserem Versuchssetting bestätigen sich auch diese Ergebnisse bezüglich der HO-2-Expression. Im Kortex findet sich bei der Clamping-Gruppe eine leichte Expressionssteigerung in der frühen postischämischen Phase, wahrscheinlich eine Reaktion auf die erhöhten Hämkonzentrationen, wie bereits bei der HO-1 beschrieben. Die mit SnMP behandelten Tiere dagegen zeigen keine signifikanten Veränderungen, wohl durch die hemmende Eigenschaft des SnMPs auf den Proteingehalt der HO-2⁴⁴. In der Medulla, wo HO-2 unter physiologischen Bedingungen die stärker exprimierte Isoform ist¹⁵⁹, sind dagegen die Steigerung in der Clamping-Gruppe und der im Vergleich ausbleibende Anstieg in der Clamping + SnMP-Gruppe ausgeprägter zu

sehen. Einen Grund dafür liefert die bereits erwähnte kompartimentär unterschiedliche Verteilung der Isoformen.

4.3.2 Endotheliale Stickoxidsynthase und lösliche Guanylatzyklase

Der im Endothel gebildete Signalstoff NO spielt für die Nierenphysiologie eine wichtige Rolle, da er viele ihrer Mechanismen wie z.B. die Filtrationsfunktion¹¹³, die renalen Hämodynamik¹¹⁹ oder das tubuloglomeruläre Feedback¹¹⁶ beeinflusst. In der Pathophysiologie des akuten ischämischen Nierenversagens sind sowohl protektive, als auch schädigende Effekte von NO bekannt, letztere sind primär auf den nitrosativen Stress zurückzuführen, den das Folgeprodukt von NO, Peroxynitrit, verursacht¹¹².

Die Heterogenität der NO-Effekte ist abhängig vom Bildungsort, von der Wirkdauer und der gleichzeitigen Anwesenheit freier Sauerstoffradikaler. Die Imbalance zwischen Expression und Aktivität der induzierbaren (iNOS) und der konstitutiven endothelialen Isoform der Stickoxidsynthase (eNOS) trägt dabei zur Pathophysiologie des ANVs bei¹⁴. Die für die eNOS typische intermittierend spitzenartige NO-Produktion¹⁶⁰ aktiviert Hämoproteine wie die lösliche Guanylatzyklase (sGC), vermittelt die Vasorelaxation über cGMP und kalziumgesteuerte Kalium-Kanäle, bietet Schutz vor oxidativem Stress durch Interaktion mit der mitochondrialen Atmungskette¹²², und besitzt außerdem einen antiapoptotischen Effekt¹⁶¹. Dagegen bringt die kontinuierliche Bildung von NO in hohen Konzentrationen durch iNOS die Gefahr von Lipidperoxidation, DNA-Schädigung und proapoptotischen Effekten mit sich¹³⁴. Außerdem vermindert die hohe NO-Produktion der iNOS möglicherweise die Aktivität der als renoprotektiv beschriebenen eNOS¹⁴. Es wurde bereits gezeigt, dass die selektive Hemmung der iNOS durch L-Nil eine Verbesserung im ischämischen Nierenschaden bewirkt¹³⁸.

Die gestörte Balance zwischen eNOS und iNOS spiegelt die im ischämischen ANV gestörte komplexe Wechselwirkung zwischen Endothel und Epithelzellen wieder und tritt als Folge der endothelialen Dysfunktion auf, welche im Pathomechanismus einer renalen Ischämie eine entscheidende Rolle spielt. Kernpunkte der endothelialen Dysfunktion sind u. a. eine gestörte Vasorelaxation¹⁶² und die Überexpression des für die Leukozytenmigration wichtigen interzellulären Adhäsionsmoleküls-1 (ICAM-1)²¹.

Da beide Funktionen unter physiologischen Bedingungen durch NO reguliert werden, weist deren Störung auf eine fehlerhafte NO-Produktion und eine Beeinträchtigung der NOS-Funktion hin.

Durch Defizite des Substrats L-Arginin und des Kofaktors Tetrahydrobiopterin, der bei oxidativem Stress zu Dihydrobiopterin oxidiert wird¹⁶³, kommt es zur Entkopplung der NO-Produktion. Die eNOS fungiert in diesem Falle nur noch als NADPH-Oxidase und produziert Superoxid. Durch eine Verbindung der Radikale Superoxid und NO entsteht Peroxynitrit, welches als hochreaktives Radikal wiederum zur Oxidation und Inaktivierung der NOS-Kofaktoren führt. Peroxynitrit nitriert aromatische Reste an Proteinen oder Nukleinsäuren, wodurch deren biologische Aktivität beeinträchtigt wird¹⁶⁴. Es erhöht allerdings auch die HO-1 Genexpression, welche im Gegenzug durch Stimulierung der extrazellulären Superoxid-Dismutase, einen Radikalfänger des Superoxidanions, die eNOS vor der Entkopplung schützt¹⁶⁵.

Aufbauend auf diesen Voraussetzungen wurde die Expression der eNOS unter normalen pathophysiologischen Bedingungen und unter Hemmung der HO-1 gemessen, um auf das Ausmaß der Wechselwirkung zwischen den beiden Enzymen näher einzugehen.

In der Clamping-Gruppe zeigte sich in den kortikalen Proben nach der Ischämie bereits frühzeitig einen Anstieg der eNOS-Expression, während dieser in der Clamping + SnMP-Gruppe deutlich geringer ausfällt. Diese Diskrepanz könnte durch die Zytotoxizitätszunahme unter Hemmung der HO-1 entstehen. Hieraus könnte eine stärkere Schädigung mit einer vermehrten Produktion reaktiver Sauerstoffspezies resultieren. Es wurde bereits gezeigt, dass Hypoxie u. a. die Expression der eNOS hemmen kann¹⁶⁶. Ebenso kann der bei SnMP-Gabe ausgeprägtere Ischämieschaden mit stärker geschädigten Zellen ein Sistieren der Protein-Synthese bedingen und so ein Grund für den im Vergleich geringeren Nachweis der eNOS-Expression sein. Während die Expression der eNOS im weiteren Verlauf in der Clamping-Gruppe noch hochreguliert bleibt, möglicherweise ein Zeichen erhöhten Bedarfs bei bereits wieder rasch sinkenden HO-1 Konzentrationen, ist die eNOS-Expression der Clamping + SnMP-Gruppe im Vergleich dazu weiterhin reduziert nachweisbar. Ein weiterer möglicher Erklärungsansatz hierfür ist die induzierbare NOS, für die dargestellt ist, dass sie ebenfalls die eNOS-Aktivität hemmen kann¹⁴. Dieser Mechanismus könnte im Sinne einer Feedbackregulation bedarfsorientiert zu einer Hochregulierung der eNOS führen.

In der Clamping + SnMP-Gruppe mit noch hochregulierter HO-1 kann es dagegen zur Expressionshemmung der iNOS durch die HO-1 kommen⁴⁴. Dadurch könnten die Hemmung der eNOS und damit der Grund für deren verstärkte Expression entfallen.

In den medullären Proben ist dieser Unterschied zwischen den unbehandelten und den mit SnMP-behandelten Tieren weit schwächer ausgeprägt, möglicherweise wieder eine Folge der komplementären Verteilung der HO-Isoformen, da in der Medulla die konstitutive HO-2 vorherrscht.

Um dieser endothelialen Funktionseinschränkung weiter nachzugehen, und um auch die Folgen einer HO-1 Hemmung zu untersuchen, wurde die Expression der löslichen Guanylatzyklase anhand der β -Untereinheit überprüft. Hier deutet sich in der Clamping-Gruppe eine im Lauf der ersten Woche stetig ansteigende Expression der sGC an, was mit bereits aus unserer Arbeitsgruppe veröffentlichten Daten korreliert. Die sGC- β -Hochregulierung war im renalen Kortex ausgeprägter als in der Medulla. Dies deckt sich auch mit anderen Arbeiten und lässt als Ursache auf eine Reaktion auf ein vorhandenes NO-Defizit im Rahmen der endothelialen Dysfunktion schliessen¹⁴⁶. Die SnMP-behandelten Tiere zeigten ausgehend von einer niedrigeren Expression am ersten postinterventionellen Tag einen ähnlichen Verlauf, jedoch insgesamt im Trend geringer ausgeprägt als die Clamping-Tiere. Ein Erklärungsansatz für diese Beobachtung liegt in der Tatsache, dass Hypoxie die Expression der sGC hemmt¹⁶⁷. Die Hemmung der HO-1-Aktivität in der Clamping + SnMP-Gruppe könnte stärkere Auswirkungen der Hypoxie nach sich ziehen, und somit könnte auch die Expression der sGC stärker beeinträchtigt sein. Die nachlassende Wirkung des SnMP auf die Aktivität der HO-1 und die gleichzeitig bestehende Expressionsinduktion im weiteren Versuchsverlauf würde einer bedarfsorientierten Hochregulierung der sGC nun nicht mehr entgegenwirken, jedoch bleibt sie hinter der Expressionsteigerung der Clamping-Gruppe aufgrund ihres niedrigeren Tag-1-Wertes zurück.

4.3.3 Biliverdinreduktase

Als hochpotente Antioxidanzien haben Biliverdin und Bilirubin einen großen Anteil an den Schutzmechanismen in der Hämabbaukaskade. Der bereits beschriebene Schutz vor

der eNOS-Entkopplung, vermittelt durch die HO-1, besteht möglicherweise in der von Bilirubin ausgelösten Hemmung der Proteinkinase C und der NADPH-Oxidase¹⁶⁸.

Wie bereits erwähnt, besteht die bemerkenswerte protektive Effizienz des Bilirubins darin, dass es mit der BVR einen Redoxzyklus bildet, der durch kontinuierliches Reduzieren von Biliverdin zu Bilirubin einen nahezu unerschöpflichen Substratvorrat zur Reduktion freier Radikaler, wie Peroxinitrit und reaktiver Sauerstoffspezies, bereitstellt⁵⁸. Damit schützt es nicht nur vor oxidativem, sondern auch vor nitrosativem Stress⁹⁶.

Die Biliverdinreduktase wird bei erhöhtem Umsatz im selben Maße wie die HO-1 verstärkt exprimiert. Als Aktivatoren der BVR werden Insulin und freie Radikale beschrieben¹⁶⁹. In der Clamping-Gruppe ist mit der Induktion der HO-1 auch eine Induktion der BVR zu erwarten. Die Ergebnisse bestätigen diese Annahme, es zeigen sich erhöhte Proteinwerte in renalem Kortex und Medulla. Unter Inhibition der HO-1 in der Clamping + SnMP-Gruppe fehlt diese Hochregulierung erwartungsgemäß. Die Schlussfolgerungen von Studien, die sich isoliert mit den protektiven Effekten von Bilirubin auseinandergesetzt haben, dass sich ein wichtiger zytoprotektiver und antiinflammatorischer Effekt der HO-1-Induktion aus der Wirkung des Folgeprodukts Bilirubin ergibt, bestätigen sich durch die stärkere Funktionseinschränkung der mit SnMP behandelten Tiere.

4.4 Validität des Versuchsmodells für das ANV beim Menschen

Das akute Nierenversagen des Menschen hat oft eine multifaktorielle Genese, die häufigste Ursache für das ischämische ANV ist dabei die postoperative oder hypotone Hypovolämie. Die Versuche, an Ratten unter septischen oder hypotensiven Bedingungen ein ANV zu provozieren, führten bisher nicht zum gewünschten reproduzierbaren Erfolg¹⁷⁰. Daraus resultierend wurden Methoden entwickelt, die sich der einzelnen Auslöser isoliert bedienen^{37,171-173}. Um das ischämische ANV des Menschen im Tiermodell nachzustellen, hat sich inzwischen die totale Unterbindung der Nierendurchblutung über ein bestimmtes Zeitintervall als Methode der Wahl etabliert. Dennoch muss bedacht werden, dass dieses Versuchsmodell nicht die Komplexität des ANV beim Menschen, das nicht selten multifaktorieller Genese ist, wiedergeben kann.

Unterschiede zeigen sich demnach auch in den morphologischen Veränderungen. Das ANV in Ratten wird charakterisiert durch ausgeprägte Nekrosen der proximalen Tubuli mit geringerer Schädigung des distalen Nephrons und fokalen Nekrosen im tubulären Konvolut und den Sammelrohren¹⁷⁴⁻¹⁷⁶. Beim Menschen dagegen fällt die tubuläre Nekrose weit milder aus, morphologische Schäden finden sich proximal und distal gleichermaßen und sind eher fokal verteilt¹⁷⁷⁻¹⁷⁹. Gemeinsamkeiten finden sich in der Zerstörung des Bürstensaums im S3-Segment, der Lokalisation der stärksten Schädigung, und in der Bildung von Detrituszylindern in den Tubuli.

Im Rattenmodell verursacht die anhaltende Vasokonstriktion und das Anschwellen der Zellen einen verminderten Blutrückfluss in die Rinden-Mark-Grenze während der Reperfusion^{180,181}. Diese weiter bestehende Ischämie protrahiert so den Schaden durch die eigentliche Ischämiephase. Maßnahmen, die den Blutfluss verbessern sollten, hatten hier großen Erfolg bezüglich des Schadenausmaßes und der Regeneration^{172,180,181}. Jedoch ist vorsichtig zu bewerten, in wie fern die Beobachtungen zur Hämodynamik auf den Menschen anwendbar sind, da doch mit der relativen Breite der Medulla morphologische Unterschiede bestehen, die sich auch funktionell auswirken¹⁸².

Die bisher entwickelten Krankheitsmodelle dienen den Bestrebungen, das ischämische akute Nierenversagen im Menschen besser zu verstehen, vor allem dann, wenn sie zur Bestätigung und Validierung immer wieder auf klinische Beobachtungen zurückgreifen. Aufgrund der Komplexität des Krankheitsbildes haben sich zahlreiche Versuchsmodelle entwickelt, von der Grundlagenforschung in Zellkulturen bis zum Tierversuchsmodell. Jedes Konzept beleuchtet oft nur einen Aspekt des Gesamtbildes, was einerseits dessen Aussagekraft einschränkt, andererseits jedoch neue Perspektiven und Einsichten in die komplexen Pathomechanismen des ANVs liefert.

Die Signifikanz einzelner Ergebnisse wird sich jedoch erst im weiteren Verlauf ergeben, wenn sie mit wachsendem Verstehen der Erkrankung in den Rahmen des Gesamtbildes eingefügt werden können.

5 Zusammenfassung

Das akute Nierenversagen aufgrund ischämischer oder toxischer Nierenschädigung ist eine häufig auftretende Erkrankung mit einer hohen Mortalität. Immer noch sind die genauen Abläufe auf Zellebene nicht vollständig geklärt.

Diese Arbeit befasst sich mit der Rolle der induzierbaren Hämoxxygenase (HO-1) und ihrer Wechselwirkung mit der endothelialen Stickoxidsynthase (eNOS) im akuten ischämischen Nierenversagen. Dazu wurde im Rattenmodell mittels 45-minütigen Clamping beider Aa. renales ein ischämischer ANV induziert. Während eine Gruppe dem Clamping ohne weitere Intervention unterzogen wurde, ist einer weiteren Gruppe Zinn(VI)-Mesoporphyrin (SnMP), ein Inhibitor der HO-1, intraperitoneal appliziert worden. Eine dritte Gruppe mit Schein-Operation wurde als unbehandelte Kontrollgruppe parallel operiert und untersucht. Zur Bestimmung von renaler Filtrations- und Sekretionsfunktion wurden die Inulin-Clearance und die PAH-Clearance gemessen. Die Expression der untersuchten Enzyme aus HO/CO- und NOS/NO-System wurde mittels Westernblot quantitativ bestimmt. Der postinterventionelle Versuchszeitraum erstreckte sich über 14 Tage.

In der unbehandelten Clamping-Gruppe zeigte sich ein Abfall von Inulin- und PAH-Clearance in der frühen postischämischen Phase, gefolgt von einer raschen Erholung und stetiger Verbesserung der Exkretionsfunktion im Verlauf des 14-tägigen Versuchsintervalls. Die HO-1 zeigte einen Tag nach der Ischämie eine starke Überexpression, ebenso die im Hämatabolismus wichtige Biliverdinreduktase (BVR). Die eNOS reagierte mit einer Hochregulierung, die sich in der Medulla langsamer entwickelte als in Kortex. Der gemeinsame Rezeptor der Signalstoffe CO und NO, die lösliche Guanylatzyklase (sGC), zeigte eine bedarfsgesteuerte leichte Hochregulation, möglicherweise ein Zeichen der endothelialen Dysfunktion mit zunächst nicht ausreichender NO-Bildung durch die eNOS.

Die Clamping + SnMP-Gruppe erlitt eine stärkere Funktionseinschränkung nach der Intervention, was sich mit der Hemmung der HO-1 erklärt, regenerierte sich anschließend rasch wieder und hatte im Versuchsverlauf vergleichbare Funktionswerte wie die Clamping-Gruppe. Die HO-1 wurde ebenso akut hochreguliert, hielt aber die starken Überexpressionswerte während des Versuchszeitraums länger aufrecht als die Clamping-Gruppe. Diese Beobachtung lässt sich mit der Eigenschaft des SnMP erklären, dass es die Aktivität der HO-1 hemmt, ihre Expression aber steigert. Die Hochregulation der BVR war in dieser Gruppe geringer ausgeprägt. Die eNOS wurde in den mit SnMP behandelten Tieren weit schwächer exprimiert. Die sGC zeigte ähnliche Werte wie in der Clamping-Gruppe, wenn auch weniger stark reguliert.

Die Beobachtung, dass sich eine Hemmung der HO-1 nicht nur auf die Enzyme ihres eigenen Signalweges und des Hämabbaus, der sGC und der BVR, auswirkt, sondern auch auf die der eNOS, bestätigt, dass das HO/CO- und das NOS/NO-System eng miteinander verknüpft sind. Dass dies nicht nur unter physiologischen Bedingungen, sondern insbesondere in der pathologischen Situation einer renalen Ischämie zum Tragen kommt, eröffnet Perspektiven, dass die dargestellten Ergebnisse dazu dienen könnten, neue Ansätze zu finden, um die endotheliale Dysfunktion im ANV kurativ zu beeinflussen.

Literaturverzeichnis

1. Lameire N, Van Biesen W, Vanholder R. Acute renal failure. *Lancet* 2005;**365**(9457):417-30.
2. Carmichael P, Carmichael AR. Acute renal failure in the surgical setting. *ANZ J Surg* 2003;**73**(3):144-53.
3. Nakao A, Neto JS, Kanno S, et al. Protection against ischemia/reperfusion injury in cardiac and renal transplantation with carbon monoxide, biliverdin and both. *Am J Transplant* 2005;**5**(2):282-91.
4. Barsoum RS. Tropical acute renal failure. *Contrib Nephrol* 2004;**144**:44-52.
5. Nash K, Hafeez A, Hou S. Hospital-acquired renal insufficiency. *Am J Kidney Dis* 2002;**39**(5):930-6.
6. Sever MS, Ereke E, Vanholder R, et al. Lessons learned from the Marmara disaster: Time period under the rubble. *Crit Care Med* 2002;**30**(11):2443-9.
7. Bonventre JV, Weinberg JM. Recent advances in the pathophysiology of ischemic acute renal failure. *J Am Soc Nephrol* 2003;**14**(8):2199-210.
8. Blantz RC. Pathophysiology of pre-renal azotemia. *Kidney Int* 1998;**53**(2):512-23.
9. Baylis C, Brenner BM. Modulation by prostaglandin synthesis inhibitors of the action of exogenous angiotensin II on glomerular ultrafiltration in the rat. *Circ Res* 1978;**43**(6):889-98.
10. De Nicola L, Blantz RC, Gabbai FB. Nitric oxide and angiotensin II. Glomerular and tubular interaction in the rat. *J Clin Invest* 1992;**89**(4):1248-56.
11. Badr KF, Ichikawa I. Prerenal failure: a deleterious shift from renal compensation to decompensation. *N Engl J Med* 1988;**319**(10):623-9.
12. Hollenberg NK, Adams DF, Oken DE, Abrams HL, Merrill JP. Acute renal failure due to nephrotoxins. *N Engl J Med* 1970;**282**(24):1329-34.
13. Hollenberg NK, Epstein M, Rosen SM, Basch RI, Oken DE, Merrill JP. Acute oliguric renal failure in man: evidence for preferential renal cortical ischemia. *Medicine (Baltimore)* 1968;**47**(6):455-74.
14. Brodsky SV, Yamamoto T, Tada T, et al. Endothelial dysfunction in ischemic acute renal failure: rescue by transplanted endothelial cells. *Am J Physiol Renal Physiol* 2002;**282**(6):F1140-9.
15. Molitoris BA. Actin cytoskeleton in ischemic acute renal failure. *Kidney Int* 2004;**66**(2):871-83.
16. Lameire NH, Vanholder R. Pathophysiology of ischaemic acute renal failure. *Best Pract Res Clin Anaesthesiol* 2004;**18**(1):21-36.
17. Alejandro VS, Nelson WJ, Huie P, et al. Postischemic injury, delayed function and Na⁺/K⁺-ATPase distribution in the transplanted kidney. *Kidney Int* 1995;**48**(4):1308-15.
18. Thadhani R, Pascual M, Bonventre JV. Acute renal failure. *N Engl J Med* 1996;**334**(22):1448-60.
19. Zuk A, Bonventre JV, Matlin KS. Expression of fibronectin splice variants in the postischemic rat kidney. *Am J Physiol Renal Physiol* 2001;**280**(6):F1037-53.
20. Sutton TA, Fisher CJ, Molitoris BA. Microvascular endothelial injury and dysfunction during ischemic acute renal failure. *Kidney Int* 2002;**62**(5):1539-49.
21. Bonventre JV, Zuk A. Ischemic acute renal failure: an inflammatory disease? *Kidney Int* 2004;**66**(2):480-5.

22. Ysebaert DK, De Greef KE, De Beuf A, et al. T cells as mediators in renal ischemia/reperfusion injury. *Kidney Int* 2004;**66**(2):491-6.
23. Brivet FG, Kleinknecht DJ, Loirat P, Landais PJ. Acute renal failure in intensive care units--causes, outcome, and prognostic factors of hospital mortality; a prospective, multicenter study. French Study Group on Acute Renal Failure. *Crit Care Med* 1996;**24**(2):192-8.
24. Khan IH, Catto GR, Edward N, Macleod AM. Acute renal failure: factors influencing nephrology referral and outcome. *Qjm* 1997;**90**(12):781-5.
25. Liano F, Junco E, Pascual J, Madero R, Verde E. The spectrum of acute renal failure in the intensive care unit compared with that seen in other settings. The Madrid Acute Renal Failure Study Group. *Kidney Int Suppl* 1998;**66**:S16-24.
26. Guerin C, Girard R, Selli JM, Perdrix JP, Ayzac L. Initial versus delayed acute renal failure in the intensive care unit. A multicenter prospective epidemiological study. Rhone-Alpes Area Study Group on Acute Renal Failure. *Am J Respir Crit Care Med* 2000;**161**(3 Pt 1):872-9.
27. McCarthy JT. Prognosis of patients with acute renal failure in the intensive-care unit: a tale of two eras. *Mayo Clin Proc* 1996;**71**(2):117-26.
28. Polito C, Papale MR, La Manna A. Long-term prognosis of acute renal failure in the full-term neonate. *Clin Pediatr (Phila)* 1998;**37**(6):381-5.
29. Bhandari S, Turney JH. Survivors of acute renal failure who do not recover renal function. *Qjm* 1996;**89**(6):415-21.
30. Kellum JA. What can be done about acute renal failure? *Minerva Anesthesiol* 2004;**70**(4):181-8.
31. Kim S, Ponka P. Nitrogen monoxide-mediated control of ferritin synthesis: implications for macrophage iron homeostasis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;**99**(19):12214-9.
32. Hill-Kapturczak N, Chang SH, Agarwal A. Heme oxygenase and the kidney. *DNA Cell Biol* 2002;**21**(4):307-21.
33. Balla J, Jacob HS, Balla G, Nath K, Eaton JW, Vercellotti GM. Endothelial-cell heme uptake from heme proteins: induction of sensitization and desensitization to oxidant damage. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993;**90**(20):9285-9.
34. Jeney V, Balla J, Yachie A, et al. Pro-oxidant and cytotoxic effects of circulating heme. *Blood* 2002;**100**(3):879-87.
35. Nath KA, Grande JP, Croatt AJ, Likely S, Hebbel RP, Enright H. Intracellular targets in heme protein-induced renal injury. *Kidney Int* 1998;**53**(1):100-11.
36. Vercellotti GM, Balla G, Balla J, Nath K, Eaton JW, Jacob HS. Heme and the vasculature: an oxidative hazard that induces antioxidant defenses in the endothelium. *Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol* 1994;**22**(2):207-13.
37. Nath KA, Balla G, Vercellotti GM, et al. Induction of heme oxygenase is a rapid, protective response in rhabdomyolysis in the rat. *J Clin Invest* 1992;**90**(1):267-70.
38. Shimizu H, Takahashi T, Suzuki T, et al. Protective effect of heme oxygenase induction in ischemic acute renal failure. *Crit Care Med* 2000;**28**(3):809-17.
39. Shiraishi F, Curtis LM, Truong L, et al. Heme oxygenase-1 gene ablation or expression modulates cisplatin-induced renal tubular apoptosis. *Am J Physiol Renal Physiol* 2000;**278**(5):F726-36.
40. Maines MD. The heme oxygenase system: a regulator of second messenger gases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1997;**37**:517-54.

41. Tenhunen R, Marver HS, Schmid R. Microsomal heme oxygenase. Characterization of the enzyme. *J Biol Chem* 1969;**244**(23):6388-94.
42. McCoubrey WK, Jr., Huang TJ, Maines MD. Isolation and characterization of a cDNA from the rat brain that encodes hemoprotein heme oxygenase-3. *Eur J Biochem* 1997;**247**(2):725-32.
43. Sikorski EM, Hock T, Hill-Kapturczak N, Agarwal A. The story so far: Molecular regulation of the heme oxygenase-1 gene in renal injury. *Am J Physiol Renal Physiol* 2004;**286**(3):F425-41.
44. da Silva JL, Zand BA, Yang LM, Sabaawy HE, Lianos E, Abraham NG. Heme oxygenase isoform-specific expression and distribution in the rat kidney. *Kidney Int* 2001;**59**(4):1448-57.
45. Toda N, Takahashi T, Mizobuchi S, et al. Tin chloride pretreatment prevents renal injury in rats with ischemic acute renal failure. *Crit Care Med* 2002;**30**(7):1512-22.
46. Wiesel P, Patel AP, Carvajal IM, et al. Exacerbation of chronic renovascular hypertension and acute renal failure in heme oxygenase-1-deficient mice. *Circ Res* 2001;**88**(10):1088-94.
47. Denninger JW, Marletta MA. Guanylate cyclase and the .NO/cGMP signaling pathway. *Biochim Biophys Acta* 1999;**1411**(2-3):334-50.
48. Katori M, Busuttill RW, Kupiec-Weglinski JW. Heme oxygenase-1 system in organ transplantation. *Transplantation* 2002;**74**(7):905-12.
49. Csonka C, Varga E, Kovacs P, et al. Heme oxygenase and cardiac function in ischemic/reperfused rat hearts. *Free Radic Biol Med* 1999;**27**(1-2):119-26.
50. Bonnell MR, Visner GA, Zander DS, et al. Heme-oxygenase-1 expression correlates with severity of acute cellular rejection in lung transplantation. *J Am Coll Surg* 2004;**198**(6):945-52.
51. Agarwal A, Nick HS. Renal response to tissue injury: lessons from heme oxygenase-1 GeneAblation and expression. *J Am Soc Nephrol* 2000;**11**(5):965-73.
52. Maines MD, Raju VS, Panahian N. Spin trap (N-t-butyl-alpha-phenylnitron)-mediated suprainduction of heme oxygenase-1 in kidney ischemia/reperfusion model: role of the oxygenase in protection against oxidative injury. *J Pharmacol Exp Ther* 1999;**291**(2):911-9.
53. Amersi F, Buelow R, Kato H, et al. Upregulation of heme oxygenase-1 protects genetically fat Zucker rat livers from ischemia/reperfusion injury. *J Clin Invest* 1999;**104**(11):1631-9.
54. Datta PK, Koukouritaki SB, Hopp KA, Lianos EA. Heme oxygenase-1 induction attenuates inducible nitric oxide synthase expression and proteinuria in glomerulonephritis. *J Am Soc Nephrol* 1999;**10**(12):2540-50.
55. Agarwal A, Balla J, Alam J, Croatt AJ, Nath KA. Induction of heme oxygenase in toxic renal injury: a protective role in cisplatin nephrotoxicity in the rat. *Kidney Int* 1995;**48**(4):1298-307.
56. Maines MD, Mayer RD, Ewing JF, McCoubrey WK, Jr. Induction of kidney heme oxygenase-1 (HSP32) mRNA and protein by ischemia/reperfusion: possible role of heme as both promotor of tissue damage and regulator of HSP32. *J Pharmacol Exp Ther* 1993;**264**(1):457-62.

57. Balla G, Vercellotti GM, Muller-Eberhard U, Eaton J, Jacob HS. Exposure of endothelial cells to free heme potentiates damage mediated by granulocytes and toxic oxygen species. *Lab Invest* 1991;**64**(5):648-55.
58. Baranano DE, Rao M, Ferris CD, Snyder SH. Biliverdin reductase: a major physiologic cytoprotectant. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;**99**(25):16093-8.
59. Kaide JI, Zhang F, Wei Y, et al. Carbon monoxide of vascular origin attenuates the sensitivity of renal arterial vessels to vasoconstrictors. *J Clin Invest* 2001;**107**(9):1163-71.
60. Haider A, Olszanecki R, Gryglewski R, et al. Regulation of cyclooxygenase by the heme-heme oxygenase system in microvessel endothelial cells. *J Pharmacol Exp Ther* 2002;**300**(1):188-94.
61. Sacerdoti D, Escalante B, Abraham NG, McGiff JC, Levere RD, Schwartzman ML. Treatment with tin prevents the development of hypertension in spontaneously hypertensive rats. *Science* 1989;**243**(4889):388-90.
62. Suttner DM, Sridhar K, Lee CS, Tomura T, Hansen TN, Dennery PA. Protective effects of transient HO-1 overexpression on susceptibility to oxygen toxicity in lung cells. *Am J Physiol* 1999;**276**(3 Pt 1):L443-51.
63. Zhang J, Piantadosi CA. Mitochondrial oxidative stress after carbon monoxide hypoxia in the rat brain. *J Clin Invest* 1992;**90**(4):1193-9.
64. Platt JL, Nath KA. Heme oxygenase: protective gene or Trojan horse. *Nat Med* 1998;**4**(12):1364-5.
65. Motterlini R, Mann BE, Foresti R. Therapeutic applications of carbon monoxide-releasing molecules. *Expert Opin Investig Drugs* 2005;**14**(11):1305-18.
66. Foresti R, Hammad J, Clark JE, et al. Vasoactive properties of CORM-3, a novel water-soluble carbon monoxide-releasing molecule. *Br J Pharmacol* 2004;**142**(3):453-60.
67. Bani-Hani MG, Greenstein D, Mann BE, Green CJ, Motterlini R. Modulation of thrombin-induced neuroinflammation in BV-2 microglia by carbon monoxide-releasing molecule 3. *J Pharmacol Exp Ther* 2006;**318**(3):1315-22.
68. Boissiere J, Lemaire MC, Antier D, Courteix D, Bonnet P. Exercise and vasorelaxing effects of CO-releasing molecules in hypertensive rats. *Med Sci Sports Exerc* 2006;**38**(4):652-9.
69. Chlopicki S, Olszanecki R, Marcinkiewicz E, Lomnicka M, Motterlini R. Carbon monoxide released by CORM-3 inhibits human platelets by a mechanism independent of soluble guanylate cyclase. *Cardiovasc Res* 2006;**71**(2):393-401.
70. Musameh MD, Fuller BJ, Mann BE, Green CJ, Motterlini R. Positive inotropic effects of carbon monoxide-releasing molecules (CO-RMs) in the isolated perfused rat heart. *Br J Pharmacol* 2006;**149**(8):1104-12.
71. Sandouka A, Fuller BJ, Mann BE, Green CJ, Foresti R, Motterlini R. Treatment with CO-RMs during cold storage improves renal function at reperfusion. *Kidney Int* 2006;**69**(2):239-47.
72. Ryter SW, Alam J, Choi AM. Heme oxygenase-1/carbon monoxide: from basic science to therapeutic applications. *Physiol Rev* 2006;**86**(2):583-650.
73. Zhang F, Kaide JI, Rodriguez-Mulero F, Abraham NG, Nasjletti A. Vasoregulatory function of the heme-heme oxygenase-carbon monoxide system. *Am J Hypertens* 2001;**14**(6 Pt 2):62S-67S.

74. Johnson RA, Lavesa M, Askari B, Abraham NG, Nasjletti A. A heme oxygenase product, presumably carbon monoxide, mediates a vasodepressor function in rats. *Hypertension* 1995;**25**(2):166-9.
75. Kozma F, Johnson RA, Zhang F, Yu C, Tong X, Nasjletti A. Contribution of endogenous carbon monoxide to regulation of diameter in resistance vessels. *Am J Physiol* 1999;**276**(4 Pt 2):R1087-94.
76. Marks GS, Brien JF, Nakatsu K, McLaughlin BE. Does carbon monoxide have a physiological function? *Trends Pharmacol Sci* 1991;**12**(5):185-8.
77. Wang R, Wu L, Wang Z. The direct effect of carbon monoxide on KCa channels in vascular smooth muscle cells. *Pflugers Arch* 1997;**434**(3):285-91.
78. Johnson FK, Teran FJ, Prieto-Carrasquero M, Johnson RA. Vascular effects of a heme oxygenase inhibitor are enhanced in the absence of nitric oxide. *Am J Hypertens* 2002;**15**(12):1074-80.
79. Aizawa T, Ishizaka N, Taguchi J, et al. Heme oxygenase-1 is upregulated in the kidney of angiotensin II-induced hypertensive rats : possible role in renoprotection. *Hypertension* 2000;**35**(3):800-6.
80. Arregui B, Lopez B, Garcia Salom M, Valero F, Navarro C, Fenoy FJ. Acute renal hemodynamic effects of dimanganese decacarbonyl and cobalt protoporphyrin. *Kidney Int* 2004;**65**(2):564-74.
81. O'Donoghue TL, Walker BR. Renal vasodilatory influence of endogenous carbon monoxide in chronically hypoxic rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2000;**279**(6):H2908-15.
82. Rodriguez F, Zhang F, Dinocca S, Nasjletti A. Nitric oxide synthesis influences the renal vascular response to heme oxygenase inhibition. *Am J Physiol Renal Physiol* 2003;**284**(6):F1255-62.
83. Zou AP, Billington H, Su N, Cowley AW, Jr. Expression and actions of heme oxygenase in the renal medulla of rats. *Hypertension* 2000;**35**(1 Pt 2):342-7.
84. Thorup C, Jones CL, Gross SS, Moore LC, Goligorsky MS. Carbon monoxide induces vasodilation and nitric oxide release but suppresses endothelial NOS. *Am J Physiol* 1999;**277**(6 Pt 2):F882-9.
85. Johnson FK, Johnson RA. Carbon monoxide promotes endothelium-dependent constriction of isolated gracilis muscle arterioles. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2003;**285**(3):R536-41.
86. Johnson FK, Durante W, Peyton KJ, Johnson RA. Heme oxygenase inhibitor restores arteriolar nitric oxide function in dahl rats. *Hypertension* 2003;**41**(1):149-55.
87. Zuckerbraun BS, Otterbein LE, Boyle P, et al. Carbon monoxide protects against the development of experimental necrotizing enterocolitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2005;**289**(3):G607-13.
88. Morse D, Pischke SE, Zhou Z, et al. Suppression of inflammatory cytokine production by carbon monoxide involves the JNK pathway and AP-1. *J Biol Chem* 2003;**278**(39):36993-8.
89. Pae HO, Oh GS, Choi BM, et al. Carbon monoxide produced by heme oxygenase-1 suppresses T cell proliferation via inhibition of IL-2 production. *J Immunol* 2004;**172**(8):4744-51.
90. Mustafa MG, Cowger ML, King TE. Effects of bilirubin on mitochondrial reactions. *J Biol Chem* 1969;**244**(23):6403-14.

91. Ostrow JD, Pascolo L, Shapiro SM, Tiribelli C. New concepts in bilirubin encephalopathy. *Eur J Clin Invest* 2003;**33**(11):988-97.
92. Kapitulnik J. Bilirubin: an endogenous product of heme degradation with both cytotoxic and cytoprotective properties. *Mol Pharmacol* 2004;**66**(4):773-9.
93. Stocker R, Yamamoto Y, McDonagh AF, Glazer AN, Ames BN. Bilirubin is an antioxidant of possible physiological importance. *Science* 1987;**235**(4792):1043-6.
94. Foresti R, Goatly H, Green CJ, Motterlini R. Role of heme oxygenase-1 in hypoxia-reoxygenation: requirement of substrate heme to promote cardioprotection. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2001;**281**(5):H1976-84.
95. Dore S, Takahashi M, Ferris CD, et al. Bilirubin, formed by activation of heme oxygenase-2, protects neurons against oxidative stress injury. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;**96**(5):2445-50.
96. Kaur H, Hughes MN, Green CJ, Naughton P, Foresti R, Motterlini R. Interaction of bilirubin and biliverdin with reactive nitrogen species. *FEBS Lett* 2003;**543**(1-3):113-9.
97. Hayashi S, Takamiya R, Yamaguchi T, et al. Induction of heme oxygenase-1 suppresses venular leukocyte adhesion elicited by oxidative stress: role of bilirubin generated by the enzyme. *Circ Res* 1999;**85**(8):663-71.
98. Kirkby KA, Adin CA. Products of heme oxygenase and their potential therapeutic applications. *Am J Physiol Renal Physiol* 2006;**290**(3):F563-71.
99. Kato Y, Shimazu M, Kondo M, et al. Bilirubin rinse: A simple protectant against the rat liver graft injury mimicking heme oxygenase-1 preconditioning. *Hepatology* 2003;**38**(2):364-73.
100. Leung N, Croatt AJ, Haggard JJ, Grande JP, Nath KA. Acute cholestatic liver disease protects against glycerol-induced acute renal failure in the rat. *Kidney Int* 2001;**60**(3):1047-57.
101. Salim M, Brown-Kipphut BA, Maines MD. Human biliverdin reductase is autophosphorylated, and phosphorylation is required for bilirubin formation. *J Biol Chem* 2001;**276**(14):10929-34.
102. Maines MD, Ewing JF, Huang TJ, Panahian N. Nuclear localization of biliverdin reductase in the rat kidney: response to nephrotoxins that induce heme oxygenase-1. *J Pharmacol Exp Ther* 2001;**296**(3):1091-7.
103. Kappas A, Drummond GS. Control of heme metabolism with synthetic metalloporphyrins. *J Clin Invest* 1986;**77**(2):335-9.
104. Kappas A, Drummond GS, Munson DP, Marshall JR. Sn-Mesoporphyrin interdiction of severe hyperbilirubinemia in Jehovah's Witness newborns as an alternative to exchange transfusion. *Pediatrics* 2001;**108**(6):1374-7.
105. Martinez JC, Garcia HO, Otheguy LE, Drummond GS, Kappas A. Treatment of hyperbilirubinemia pharmacologic approach SnMP(tin-mesoporphyrin). *J Perinatol* 2001;**21 Suppl 1**:S101-3; discussion S104-7.
106. Steffensrud S. Tin-metalloporphyrins: an answer to neonatal jaundice? *Neonatal Netw* 1998;**17**(5):11-7; quiz 18-9.
107. Kappas A. A method for interdicting the development of severe jaundice in newborns by inhibiting the production of bilirubin. *Pediatrics* 2004;**113**(1 Pt 1):119-23.

108. Breslow E, Chandra R, Kappas A. Biochemical properties of the heme oxygenase inhibitor, Sn-protoporphyrin. Interactions with apomyoglobin and human serum albumin. *J Biol Chem* 1986;**261**(7):3135-41.
109. Furchgott RF, Cherry PD, Zawadzki JV, Jothianandan D. Endothelial cells as mediators of vasodilation of arteries. *J Cardiovasc Pharmacol* 1984;**6 Suppl 2**:S336-43.
110. Furchgott RF, Vanhoutte PM. Endothelium-derived relaxing and contracting factors. *Faseb J* 1989;**3**(9):2007-18.
111. Kone BC, Baylis C. Biosynthesis and homeostatic roles of nitric oxide in the normal kidney. *Am J Physiol* 1997;**272**(5 Pt 2):F561-78.
112. Groves JT. Peroxynitrite: reactive, invasive and enigmatic. *Curr Opin Chem Biol* 1999;**3**(2):226-35.
113. Deng A, Baylis C. Locally produced EDRF controls preglomerular resistance and ultrafiltration coefficient. *Am J Physiol* 1993;**264**(2 Pt 2):F212-5.
114. Bruning TA, Chang PC, Blauw GJ, Vermeij P, van Zwieten PA. Serotonin-induced vasodilatation in the human forearm is mediated by the "nitric oxide-pathway": no evidence for involvement of the 5-HT₃-receptor. *J Cardiovasc Pharmacol* 1993;**22**(1):44-51.
115. Ayajiki K, Kindermann M, Hecker M, Fleming I, Busse R. Intracellular pH and tyrosine phosphorylation but not calcium determine shear stress-induced nitric oxide production in native endothelial cells. *Circ Res* 1996;**78**(5):750-8.
116. Braam B. Renal endothelial and macula densa NOS: integrated response to changes in extracellular fluid volume. *Am J Physiol* 1999;**276**(6 Pt 2):R1551-61.
117. Rajapakse NW, Sampson AK, Eppel GA, Evans RG. Angiotensin II and nitric oxide in neural control of intrarenal blood flow. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2005;**289**(3):R745-54.
118. Schnackenberg CG, Tabor BL, Strong MH, Granger JP. Inhibition of intrarenal NO stimulates renin secretion through a macula densa-mediated mechanism. *Am J Physiol* 1997;**272**(3 Pt 2):R879-86.
119. Mattson DL, Roman RJ, Cowley AW, Jr. Role of nitric oxide in renal papillary blood flow and sodium excretion. *Hypertension* 1992;**19**(6 Pt 2):766-9.
120. Deng A, Miracle CM, Suarez JM, et al. Oxygen consumption in the kidney: effects of nitric oxide synthase isoforms and angiotensin II. *Kidney Int* 2005;**68**(2):723-30.
121. Postovit LM, Sullivan R, Adams MA, Graham CH. Nitric oxide signalling and cellular adaptations to changes in oxygenation. *Toxicology* 2005;**208**(2):235-48.
122. Xu W, Liu L, Charles IG, Moncada S. Nitric oxide induces coupling of mitochondrial signalling with the endoplasmic reticulum stress response. *Nat Cell Biol* 2004;**6**(11):1129-34.
123. Wu L, Cao K, Lu Y, Wang R. Different mechanisms underlying the stimulation of K(Ca) channels by nitric oxide and carbon monoxide. *J Clin Invest* 2002;**110**(5):691-700.
124. Watts RN, Richardson DR. Differential effects on cellular iron metabolism of the physiologically relevant diatomic effector molecules, NO and CO, that bind iron. *Biochim Biophys Acta* 2004;**1692**(1):1-15.
125. Brands MW, Bell TD, Gibson B. Nitric oxide may prevent hypertension early in diabetes by counteracting renal actions of superoxide. *Hypertension* 2004;**43**(1):57-63.

126. Fuller TF, Freise CE, Feng S, Niemann CU. Ischemic preconditioning improves rat kidney graft function after severe ischemia/reperfusion injury. *Transplant Proc* 2005;**37**(1):377-8.
127. Kurata H, Takaoka M, Kubo Y, et al. Protective effect of nitric oxide on ischemia/reperfusion-induced renal injury and endothelin-1 overproduction. *Eur J Pharmacol* 2005;**517**(3):232-9.
128. Araujo M, Welch WJ. Oxidative stress and nitric oxide in kidney function. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2006;**15**(1):72-7.
129. Palmer RM, Rees DD, Ashton DS, Moncada S. L-arginine is the physiological precursor for the formation of nitric oxide in endothelium-dependent relaxation. *Biochem Biophys Res Commun* 1988;**153**(3):1251-6.
130. Wilcox CS, Welch WJ, Murad F, et al. Nitric oxide synthase in macula densa regulates glomerular capillary pressure. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992;**89**(24):11993-7.
131. Hevel JM, Marletta MA. Macrophage nitric oxide synthase: relationship between enzyme-bound tetrahydrobiopterin and synthase activity. *Biochemistry* 1992;**31**(31):7160-5.
132. Govers R, Rabelink TJ. Cellular regulation of endothelial nitric oxide synthase. *Am J Physiol Renal Physiol* 2001;**280**(2):F193-206.
133. Abu-Soud HM, Stuehr DJ. Nitric oxide synthases reveal a role for calmodulin in controlling electron transfer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993;**90**(22):10769-72.
134. Davis KL, Martin E, Turko IV, Murad F. Novel effects of nitric oxide. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2001;**41**:203-36.
135. Keil A, Blom IE, Goldschmeding R, Rupprecht HD. Nitric oxide down-regulates connective tissue growth factor in rat mesangial cells. *Kidney Int* 2002;**62**(2):401-11.
136. Bachmann S, Mundel P. Nitric oxide in the kidney: synthesis, localization, and function. *Am J Kidney Dis* 1994;**24**(1):112-29.
137. Yamasawa H, Shimizu S, Inoue T, Takaoka M, Matsumura Y. Endothelial nitric oxide contributes to the renal protective effects of ischemic preconditioning. *J Pharmacol Exp Ther* 2005;**312**(1):153-9.
138. Noiri E, Nakao A, Uchida K, et al. Oxidative and nitrosative stress in acute renal ischemia. *Am J Physiol Renal Physiol* 2001;**281**(5):F948-57.
139. Stroes E, Hijmering M, van Zandvoort M, Wever R, Rabelink TJ, van Faassen EE. Origin of superoxide production by endothelial nitric oxide synthase. *FEBS Lett* 1998;**438**(3):161-4.
140. Vasquez-Vivar J, Kalyanaraman B, Martasek P, et al. Superoxide generation by endothelial nitric oxide synthase: the influence of cofactors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;**95**(16):9220-5.
141. Wedel BJ, Garbers DL. New insights on the functions of the guanylyl cyclase receptors. *FEBS Lett* 1997;**410**(1):29-33.
142. Stone JR, Marletta MA. The ferrous heme of soluble guanylate cyclase: formation of hexacoordinate complexes with carbon monoxide and nitrosomethane. *Biochemistry* 1995;**34**(50):16397-403.
143. Raeymaekers L, Eggermont JA, Wuytack F, Casteels R. Effects of cyclic nucleotide dependent protein kinases on the endoplasmic reticulum Ca²⁺ pump of bovine pulmonary artery. *Cell Calcium* 1990;**11**(4):261-8.

144. Wang LJ, Lee TS, Lee FY, Pai RC, Chau LY. Expression of heme oxygenase-1 in atherosclerotic lesions. *Am J Pathol* 1998;**152**(3):711-20.
145. Pryzwansky KB, Wyatt TA, Lincoln TM. Cyclic guanosine monophosphate-dependent protein kinase is targeted to intermediate filaments and phosphorylates vimentin in A23187-stimulated human neutrophils. *Blood* 1995;**85**(1):222-30.
146. Schneider R, Raff U, Vornberger N, 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):216-25.
147. Dousa TP. Cyclic-3',5'-nucleotide phosphodiesterase isozymes in cell biology and pathophysiology of the kidney. *Kidney Int* 1999;**55**(1):29-62.
148. Pfeilschifter J. Signalling pathways of nitric oxide. *Kidney Blood Press Res* 2000;**23**(3-5):159-61.
149. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976;**72**:248-54.
150. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970;**227**(5259):680-5.
151. Burnette WN. "Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate--polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Anal Biochem* 1981;**112**(2):195-203.
152. Linas S, Whittenburg D, Repine JE. Nitric oxide prevents neutrophil-mediated acute renal failure. *Am J Physiol* 1997;**272**(1 Pt 2):F48-54.
153. Yang Y, Loscalzo J. Regulation of tissue factor expression in human microvascular endothelial cells by nitric oxide. *Circulation* 2000;**101**(18):2144-8.
154. Balla J, Vercellotti GM, Jeney V, et al. Heme, heme oxygenase and ferritin in vascular endothelial cell injury. *Mol Nutr Food Res* 2005;**49**(11):1030-43.
155. Balla G, Vercellotti G, Eaton JW, Jacob HS. Heme uptake by endothelium synergizes polymorphonuclear granulocyte-mediated damage. *Trans Assoc Am Physicians* 1990;**103**:174-9.
156. Galbraith RA, Kappas A. Pharmacokinetics of tin-mesoporphyrin in man and the effects of tin-chelated porphyrins on hyperexcretion of heme pathway precursors in patients with acute inducible porphyria. *Hepatology* 1989;**9**(6):882-8.
157. Berglund L, Angelin B, Blomstrand R, Drummond G, Kappas A. Sn-protoporphyrin lowers serum bilirubin levels, decreases biliary bilirubin output, enhances biliary heme excretion and potently inhibits hepatic heme oxygenase activity in normal human subjects. *Hepatology* 1988;**8**(3):625-31.
158. Paller MS, Hoidal JR, Ferris TF. Oxygen free radicals in ischemic acute renal failure in the rat. *J Clin Invest* 1984;**74**(4):1156-64.
159. Hu Y, Ma N, Yang M, Semba R. Expression and distribution of heme oxygenase-2 mRNA and protein in rat kidney. *J Histochem Cytochem* 1998;**46**(2):249-56.
160. Tsukahara H, Gordienko DV, Goligorsky MS. Continuous monitoring of nitric oxide release from human umbilical vein endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1993;**193**(2):722-9.
161. Trachtman H, Futterweit S, Mermelstein A, Metzger S, Pettei M, Jr. Anti-apoptotic effect of L-arginine in cultured rat mesangial cells. *Int J Mol Med* 2000;**6**(4):485-9.

162. Conger J, Robinette J, Villar A, Raij L, Shultz P. Increased nitric oxide synthase activity despite lack of response to endothelium-dependent vasodilators in postischemic acute renal failure in rats. *J Clin Invest* 1995;**96**(1):631-8.
163. Milstien S, Katusic Z. Oxidation of tetrahydrobiopterin by peroxynitrite: implications for vascular endothelial function. *Biochem Biophys Res Commun* 1999;**263**(3):681-4.
164. Kuklinski B. [Zur Praxisrelevanz von nitrosativem Stress]. *umwelt-medizin-gesellschaft (Bremen)* 2005;**18**:95-106.
165. Foresti R, Sarathchandra P, Clark JE, Green CJ, Motterlini R. Peroxynitrite induces haem oxygenase-1 in vascular endothelial cells: a link to apoptosis. *Biochem J* 1999;**339** (Pt 3):729-36.
166. McQuillan LP, Leung GK, Marsden PA, Kostyk SK, Kourembanas S. Hypoxia inhibits expression of eNOS via transcriptional and posttranscriptional mechanisms. *Am J Physiol* 1994;**267**(5 Pt 2):H1921-7.
167. Hassoun PM, Filippov G, Fogel M, et al. Hypoxia decreases expression of soluble guanylate cyclase in cultured rat pulmonary artery smooth muscle cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2004;**30**(6):908-13.
168. Abraham NG, Kappas A. Heme oxygenase and the cardiovascular-renal system. *Free Radic Biol Med* 2005;**39**(1):1-25.
169. Maines MD, Miralem T, Lerner-Marmarosh N, Shen J, Gibbs PE. Human Biliverdin Reductase, a Previously Unknown Activator of Protein Kinase C betaII. *J Biol Chem* 2007;**282**(11):8110-22.
170. Zager RA. Partial aortic ligation: a hypoperfusion model of ischemic acute renal failure and a comparison with renal artery occlusion. *J Lab Clin Med* 1987;**110**(4):396-405.
171. Appel GB. Aminoglycoside nephrotoxicity. *Am J Med* 1990;**88**(3C):16S-20S; discussion 38S-42S.
172. Finn WF, Chevalier RL. Recovery from postischemic acute renal failure in the rat. *Kidney Int* 1979;**16**(2):113-23.
173. Heyman SN, Rosen S, Brezis M. Radiocontrast nephropathy: a paradigm for the synergism between toxic and hypoxic insults in the kidney. *Exp Nephrol* 1994;**2**(3):153-7.
174. Bonventre JV. Mechanisms of ischemic acute renal failure. *Kidney Int* 1993;**43**(5):1160-78.
175. Glaumann B, Glaumann H, Trump BF. Studies of cellular recovery from injury. III. Ultrastructural studies on the recovery of the pars recta of the proximal tubule (P3 segment) of the rat kidney from temporary ischemia. *Virchows Arch B Cell Pathol* 1977;**25**(4):281-308.
176. Shanley PF, Rosen MD, Brezis M, Silva P, Epstein FH, Rosen S. Topography of focal proximal tubular necrosis after ischemia with reflow in the rat kidney. *Am J Pathol* 1986;**122**(3):462-8.
177. Jones DB. Ultrastructure of human acute renal failure. *Lab Invest* 1982;**46**(3):254-64.
178. Olsen TS, Hansen HE. Ultrastructure of medullary tubules in ischemic acute tubular necrosis and acute interstitial nephritis in man. *Apmis* 1990;**98**(12):1139-48.
179. Racusen LC. Pathology of acute renal failure: structure/function correlations. *Adv Ren Replace Ther* 1997;**4**(2 Suppl 1):3-16.

180. Mason J, Welsch J, Torhorst J. The contribution of vascular obstruction to the functional defect that follows renal ischemia. *Kidney Int* 1987;**31**(1):65-71.
181. Olof P, Hellberg A, Kallskog O, Wolgast M. Red cell trapping and postischemic renal blood flow. Differences between the cortex, outer and inner medulla. *Kidney Int* 1991;**40**(4):625-31.
182. Lieberthal W, Nigam SK. Acute renal failure. II. Experimental models of acute renal failure: imperfect but indispensable. *Am J Physiol Renal Physiol* 2000;**278**(1):F1-F12.

DANKSAGUNG

Herrn Prof. Dr. med. Jan Galle gilt mein Dank für die Bereitstellung des Themas und der für die Durchführung der Arbeit benötigten Mittel.

Herrn Dr. med. Reinhard Schneider, dem direkten Betreuer der Arbeit, danke ich besonders für die freundliche und stets engagierte Betreuung bei der Planung, Durchführung und Fertigstellung dieser Arbeit, sowie seine Anregungen und die konstruktive Kritik bei der Korrektur.

Ebenso möchte ich mich bei allen Mitarbeitern des nephrologischen Labors für die sehr gute Zusammenarbeit, die freundschaftliche Hilfe und das angenehme Arbeitsklima bedanken, besonders aber bei Frau Sylvia Renker, die durch ihre Mitarbeit und ihr Fachwissen sehr zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat.

LEBENS LAUF

- Name: Diana Fischer
- Familienstand: ledig
- Nationalität: deutsch
- Geburtsdatum: 19.10.1979
- Geburtsort: Coburg
- Eltern: Heike Fischer und
Dr. med. Matthias Fischer

Ausbildung

- 1990-1999 Besuch des Gymnasium Christian-Ernestinum, Bayreuth
Leistungskurse: Biologie, Mathematik
06/1999 Allgemeine Hochschulreife
- 03/2000 Studium der Humanmedizin an der
Julius-Maximilians-Universität Würzburg
03/2002 Abschluss der Ärztlichen Vorprüfung
03/2003 Abschluss 1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
04/2005 Abschluss 2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
11/2006 Abschluss 3. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
- Famulaturen:
09/2002 Innere Medizin, KH Hohe Warte, Bayreuth
08/2003 Chirurgie mit Schwerpunkt Unfallchirurgie, Klinikum Bayreuth
03/2004 Nephrologie, Universitätsklinik Würzburg
08/2004 Pädiatrie, Praxis Drs. Jobst et Schatz, Bayreuth
- Praktisches Jahr:
10/05-01/06 Chirurgie, Universitätsspital Basel
02/06-05/06 Innere Medizin, Klinikum Coburg
06/06-09/06 Orthopädie, König-Ludwig-Haus Würzburg
- Approbation: 11/12/2006

Berufsweg

- Seit 01/06/07 Tätig als Assistenzärztin im Klinikum Nürnberg Nord, Abteilung für Allgemein-, Viszeral- und Thoraxchirurgie