

Aus der Medizinischen Klinik
der Universität Würzburg
Direktor: Professor Dr. med. G. Ertl

**Einfluß von Losartan
auf das L-Arginin/NO-System
im
ischämischen akuten
Nierenversagen
der Ratte**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der
Bayerischen Julius-Maximilians-Universität zu Würzburg
vorgelegt von
Johannes Erler
aus Memmingen
Würzburg, Juni 2001

Referent: Prof. Dr. med. Ekkehart Heidbreder

Korreferent: Prof. Dr. med. G. Ertl

Dekan: Prof. Dr. med. V. ter Meulen

Tag der mündlichen Prüfung: 23. Januar 2002

Der Promovend ist Arzt.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1. Das akute Nierenversagen	1
1.1.1. Einteilung	1
1.1.2. Pathophysiologie	2
1.2. Das L-Arginin-NO-System	4
1.2.1. Stickstoffmonoxid	4
1.2.2. Synthese von NO	6
1.2.3. Einfluß von NO auf die Funktion der Niere	8
1.3. Das Medikament Losartan	13
1.3.1. Pharmakologische Daten	14
1.3.2. Wirkungsmechanismus und Wirkungen von Losartan	15
1.4. Fragestellung	17
2. Methodik	19
2.1. Versuchstiere und Tierhaltung	19
2.2. Präparation der Tiere	19
2.2.1. Narkose	19
2.2.2. Lagerung während des Versuches	19
2.2.3. Tracheotomie	19
2.2.4. Katheterisierung der Arteria und Vena femoralis	20
2.2.5. Katheterisierung der Harnblase	21
2.2.6. Präparation der Arteriae renales	21
2.3. Versuchsaufbau	22
2.3.1. Gruppeneinteilung	22
2.3.2. Versuchsablauf und Versuchsdurchführung	22
2.4. Probenmaterialien	24
2.4.1. Probengewinnung	24
2.4.2. Aufarbeitung der Probenmaterialien	25
2.5. Statistische Methoden	26

3. Ergebnisse	29
3.1. Gewichtsverteilung	29
3.2. Urinzeitvolumen	30
3.4. Glomeruläre Filtrationsrate	32
3.5. Renaler Plasmafluß	34
3.6. Renal vaskulärer Widerstand	36
3.7. Filtrationsfraktion	38
3.8. Fraktionelle Natriumexkretion	40
3.9. Mittlerer arterieller Blutdruck	42
4. Diskussion	44
4.1. akutes ischämisches Nierenversagen durch Clamping	44
4.2. Auswirkung der Testsubstanz Losartan im akuten ischämischen Nierenversagen	46
4.3. Auswirkung der Kombination Losartan und L-Arginin im akuten ischämischen Nierenversagen	49
4.4. Auswirkung der Kombination Losartan und L-NMMA im akuten ischämischen Nierenversagen	50
5. Zusammenfassung	53
6. Anhang Statistik	55
7. Literaturverzeichnis	56
8. Danksagung	66

Abkürzungsverzeichnis

A. (Aa.)	Arterie (-n)
ACh	Acetylcholin
AD	Außendurchmesser
ADH	antidiuretisches Hormon
ADP	Adenosindiphosphat
Ang-II	Angiotensin-II
ANOVA	Analysis of Variance
ANV	akutes Nierenversagen
ATP	Adenosintriphosphat
bNOS	brain nitric oxide-synthase
Ca ²⁺	Kalzium
cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat
cNOS	constitutive nitric oxide-synthetase
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ecNOS	endothelial cell Nitric oxide-synthase
EDRF	Endothelium-derived relaxing factor
FAD	Flavinadenindinukleotid
FeNa	fraktionelle Natriumexkretion
FF	Filtrationsfraktion
FITC	Floureszein-Isothiozyanat
FMN	Flavinmononukleotid
GC-S	Guanylatzyklase
GFR	glomeruläre Filtrationsrate
GM-CSF	granulocyte macrophage colony stimulation factor
GTP	Guanosintriphosphat
Hkt	Hämatokrit
ID	Innendurchmesser
IFN- γ	Interferon gamma
IL	Interleukin
iNOS	inducable nitric oxide-synthetase
K _f	glomerulärer Ultrafiltrationskoeffizient
L-Arg	L-Arginin
L-NMMA	N ^ω -Monomethyl-L-Arginin
Los	Losartan
MAP	mittlerer arterieller Blutdruck
MW	Mittelwert
Na ⁺	Natrium
NADP/NADPH	Nikotinsäureamidadenindinukleotidphosphat
NO	nitric oxide (Stickstoffmonoxid)
NO ₂	Stickstoffdioxid
N ₂ O ₂	Stickstoffperoxid
NO ₂ ⁻	Nitrit
NO ₃	Nitrat

NOS	nitric oxide-Synthase (Stickstoffmonoxid-Synthase)
ns	nicht signifikant
p	Irrtumswahrscheinlichkeit
PAH	Paraaminohippursäure
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
R_a	afferenter arteriöler Widerstand
R_e	efferenter arteriöler Widerstand
RPF	renaler Plasmafluß
RR	mittlerer arterieller Blutdruck
RVR	renaler vaskulärer Widerstand
SEM	standard error of the mean (Standardabweichung des Mittelwertes)

1. Einleitung

1.1. Das akute Nierenversagen

Das akute Nierenversagen (ANV) ist definiert als eine plötzliche Reduktion der exkretorischen Nierenfunktion, die durch folgende Merkmale gekennzeichnet ist ^[1]:

- **rascher Abfall der glomerulären Filtrationsrate (GFR)**
- **Anstieg harnpflichtiger Substanzen (Azotämie)**

1.1.1. Einteilung

Das Nierenversagen wird je nach Ätiologie in verschiedene Formen unterteilt ^[2]:

- **prärenales Nierenversagen/zirkulatorisch-ischämisches Nierenversagen**

Ursache: Minderdurchblutung der Niere (z.B. bei Schock, Hypovolämie)

- **intrarenales Nierenversagen**

toxische Ursachen: endogene Toxine (Hämoglobin, Myoglobin)

exogene Toxine (v.a. nephrotoxische Antibiotika, Röntgenkontrastmittel)

infolge von Nierenerkrankungen: entzündlich (z.B. Glomerulonephritis, interstitielle Nephritis)

vaskulär (z.B. Gefäßverschlüsse, Eklampsie, Panarteriitis)

intravasale Gerinnung (z.B. hämolytisch-urämisches Syndrom)

- **postrenales Nierenversagen**

als Ursache liegt hier eine mechanische Obstruktion im Bereich der harnableitenden Wege (z.B. Nierensteine, Prostatahyperplasie, Tumoren) zugrunde

Die häufigste Form ist das zirkulatorisch-ischämische ANV, daß durch eine verminderte Durchblutung der Niere ausgelöst wird ^[3]. Die Ursache für die verminderte Perfusion ist eine insuffiziente Kreislauffunktion (z.B. post-operatives Kreislaufversagen), oder durch Hypovolämie (z.B. nach massiven Volumenverlusten bei polytraumatisierten Patienten).

Infolge dieser verminderten Durchblutung kommt es zu einem Abfall der GFR. Außerdem entstehen nachweisbare ischämische Einzelzellnekrosen der Tubuluszellen, wodurch eine Störung der Resorption und der exkretorischen Funktionen der Niere resultieren.

Eine Sonderform stellt das prärenal-funktionelle ANV dar. Hierbei handelt es sich um eine Form des Nierenversagens, die ebenfalls durch eine Perfusionsminderung ausgelöst wird, die aber ohne nachweisbare Schädigung der Tubuluszellen einhergeht.

Dementsprechend bilden sich die Symptome auch vollständig zurück, nachdem die Ursachen für die Minderdurchblutung (z.B. kardiogener Schock, Hypovolämie) beseitigt wurden.

Von einem sog. manifesten ANV spricht man, wenn sich die Durchblutung wieder normalisiert, aber die GFR weiterhin verringert bleibt. Ein manifestes Nierenversagen entsteht in erster Linie als Folge eines zirkulatorisch-ischämischen Nierenversagens. Es kann sich aber auch aus einem prärenal-funktionellen ANV entwickeln, nämlich dann, wenn zusätzliche schädigende Einflüsse auf die Niere wirken (z.B. Sepsis, nephrotoxische Medikamente, ACE-Hemmer).

1.1.2. Pathophysiologie

Die Pathophysiologie des akuten Nierenversagens ist sehr komplex und wird durch zahlreiche Mechanismen bestimmt. Bis heute weiß man nicht genau, wie die einzelnen Mechanismen miteinander zusammenhängen. So vermutet man für das ischämische ANV, daß durch die Ischämie eine Reihe von Vorgängen ausgelöst werden, die sich verselbständigen und so auch nach Wiederherstellung der Perfusion bestehen bleiben [4].

Charakteristisch für das akute Nierenversagen ist jedoch der Verlauf über vier Phasen, der unabhängig von der Ätiologie immer in etwa gleich abläuft:

- **Initialphase**
- **oligo-anurische Phase**
- **polyurische Phase**
- **Restitutionsphase**

Während der **Initialphase** kommt es zunächst zu einer verminderten Durchblutung der Niere, die durch Erythrozytenaggregate und Fibrinthromben verstärkt werden kann [2]. Es kommt als Folge der Ischämie zu einer Umverteilung der Nierendurchblutung.

Unter normalen Bedingungen dienen 90% des Blutvolumens, das für die Niere bestimmt ist, der Durchblutung der Nierenrinde. Im ischämischen Nierenversagen ist die Rindendurchblutung auf etwa 60% des Ausgangswertes reduziert, während die Durchblutung des Marks dagegen sogar leicht erhöht ist [4].

Da die Niere ein Organ ist, das infolge der exkretorischen Funktionen einen sehr hohen Sauerstoffbedarf aufweist, reagiert sie sehr empfindlich auf

Durchblutungsschwankungen und Hypoxie. Vor allem die Zellen des dicken aufsteigenden Teils der Henle'schen Schleife sind nicht in der Lage, ihren ATP-Bedarf durch anaerobe Glykolyse zu decken. Es kommt in diesem Bereich verstärkt zu einem Defizit energiereicher Verbindungen ^[5, 6].

Von dem Mangel energiereicher Verbindungen sind v.a. die aktiven Transportmechanismen (ATPasen) betroffen, da diese einen sehr hohen Energiebedarf aufweisen ^[7]. Für die Nierenfunktion wichtige Ionengradienten können dadurch nicht mehr aufrecht erhalten werden. Auch die Natrium-Transporter stellen ihre Funktion ein. Daraus resultieren eine Reihe weiterer Vorgänge, die zu einer Reduktion der GFR führen:

Zum einen kann Natrium nicht mehr aus den Tubuluszellen heraus transportiert werden. Die Zellen nehmen Wasser auf und schwellen an ^[8]. Begünstigt wird dieser Vorgang durch einen ischämisch bedingten Untergang des Cytoskeletts. Die vergrößerten Zellen komprimieren umliegende Kapillaren und die Tubuli. Die Folge ist eine weitere Reduktion der Nierenperfusion, wodurch die bestehende Ischämie noch verstärkt wird. Die Kompression der Tubuli, die durch Ablagerungen von Zelltrümmern im Tubuluslumen verstärkt wird, führt zu einer verringerten GFR ^[4].

Weiterhin führt der Ausfall der Natrium-Transporter führt auch zu einem verminderten Rücktransport von Na aus dem Primärharn. Die Natrium-Konzentration des Primärharns steigt an und induziert über die Makula densa eine Aktivierung des Renin-Angiotensin-Systems im juxtaglomerulären Apparat. Durch die erhöhte Angiotensin II-Aktivität kommt es zur Konstriktion des Vas afferens, wodurch die GFR weiter reduziert wird.

Mit zunehmendem Abfall der GFR erfolgt der Übergang in die oligo-anurische Phase. Die **oligo-anurische Phase** ist klinisch gekennzeichnet durch eine verminderte Diurese. Dies führt im Extremfall bis zur völligen Anurie, kann aber auch gänzlich fehlen (v.a. bei nephrotoxischem Nierenversagen) ^[9].

Durch Abfall der Diurese kann als Komplikation eine Hypervolämie mit Gefahr eines Lungenödems oder eines Herzversagens auftreten, weiterhin kann es zu Elektrolytverschiebungen und einer Urämie kommen ^[1].

Neben den oben genannten Pathomechanismen sind zahlreiche andere Veränderungen als Folge der Ischämie beschrieben:

So kommt es, vor allem im Rahmen der Reperfusion, zu einer vermehrten Bildung von Sauerstoffradikalen, die eine weitere bedeutende Zellschäden verursachen. Gleichzeitig werden Verbindungen, die die Zelle schützen (z.B. Gluthathion), infolge der Ischämie vermindert gebildet ^[4].

Eine weitere wichtige Rolle spielen die Calcium-Ionen. Es ist nachgewiesen, dass ischämisch geschädigte Zellen erhöhte intrazelluläre Ca-Konzentrationen aufweisen ^[10]. Diese Erhöhung ist ebenfalls auf eine verminderte Funktion der ATPasen zurückzuführen, die Ca entweder aus der Zelle heraus, oder in intrazelluläre Calciumspeicher hinein transportieren. Die Folgen der erhöhten intrazellulären Ca-Konzentration sind zum einen eine Stimulation der entsprechenden ATPasen, was eine Verstärkung des ATP-Mangels verursacht, zum anderen führt die hohe Ca-Konzentration zu einer Zerstörung der Cytoskeletts ^[11].

Nach ca. 8-14 Tagen tritt mit Regeneration der Tubulusepithelien eine zunehmende **Polyurie** auf. Ursache hierfür ist in erster Linie eine osmotische Diurese durch die erhöhten Natrium- und Harnstoffkonzentrationen, die im Rahmen des ANV entstanden sind. Weiterhin spielen aber auch andere Faktoren, wie z.B. eine passager auftretende ADH-Refraktärität am Sammelrohr, eine Rolle ^[2]

Im Verlauf von Wochen bis Monaten kommt es im Rahmen der **Restitutionsphase** zu einer zunehmenden Regeneration der Tubuluszellen und zu einer Wiederaufnahme der normalen Nierenfunktion.

1.2. Das L-Arginin-NO-System

Bei dem L-Arginin-NO-System handelt es sich um einen Signalweg, der in vielen Bereichen des Organismus vorkommt und der in den letzten Jahren zunehmend an Bedeutung in zahlreichen Prozessen gewonnen hat. Die zentrale Substanz dieses Transduktionsweges ist das Stickstoffmonoxid (NO).

1.2.1. Stickstoffmonoxid

Stickstoffmonoxid ist eine gasförmige Verbindung aus Sauerstoff und Stickstoff. Das Gas ist farb- und geruchslos. Es handelt sich um eine hochreaktive Verbindung mit einer sehr kurzen Halbwertszeit. Die Halbwertszeit beträgt etwa 3-5 Sekunden ^[12].

Bereits vor einigen Jahren kannte man den sog. endothelium derived relaxing factor (EDRF), eine Substanz, von der man wußte, daß diese aus dem Gefäßendothel

freigesetzt wird und daß sie eine Relaxation der glatten Gefäßmuskulatur bewirkt. In den 80er Jahren wurde diese Substanz schließlich als Stickstoffmonoxid identifiziert.

Die Wirkungen von NO im Organismus sind vielfältig: Wie erwähnt, ist NO als Signalmolekül an der Relaxation glatter Muskelzellen beteiligt. Es spielt aber auch eine wesentliche Rolle bei der Signalübertragung von Rezeptoren für Azetylcholin (ACh) und Bradykinin. Die Rezeptoren für die beiden Substanzen führen über einen Einstrom von Ca^{2+} -Ionen zu einer Induktion der NO-Synthase (NOS). Das daraus entstehende NO verursacht dann eine Vasodilatation ^[13]. Bradykinin und ACh werden deshalb auch als NO-abhängige Vasodilatoren bezeichnet.

In neuronalen Geweben beeinflusst NO die Freisetzung von Neurotransmittern und es wird eine Beteiligung bei verschiedenen Erkrankungen des ZNS diskutiert.

In höheren Konzentrationen wirkt NO als chemisches Agens bei der unspezifischen zellulären Abwehr ^[14]. Es ist an der Entstehung von Gewebsschäden bei Ischämie und Perfusion beteiligt ^[15] und hat regulatorische Einflüsse auf die DNA- und Proteinsynthese ^[16].

Vermittelt wird die Wirkung von NO über die Stimulation einer löslichen Guanylylcyclase (GC-S). Dieses Enzym katalysiert die Umwandlung von GTP zu cGMP. Das so entstandene cGMP wirkt als second messenger und aktiviert cGMP-abhängige Enzyme oder Ionenkanäle.

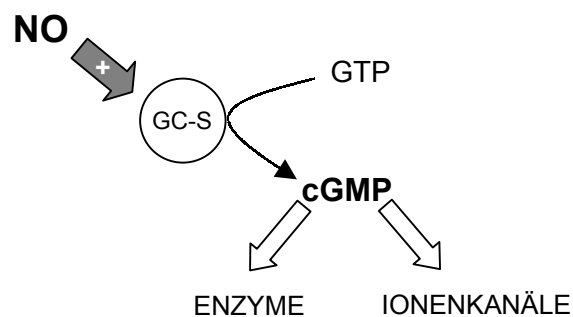


Abb. 1: Molekulare Wirkung von NO

Die Wirkung höherer NO-Konzentrationen, wie sie zum Beispiel durch aktivierte Makrophagen entstehen, werden cGMP-unabhängig vermittelt. Die NO-Effekte kommen hier durch Bildung von Nitrosoverbindungen ^[17], Enzymhemmung (v.a. Eisen-Schwefel-Enzyme) ^[18], Hydroxyradikalbildung ^[17] und Nukleinsäure-desaminierung zustande.

1.2.2. Synthese von NO

Nach heutigem Kenntnisstand wird NO enzymatisch aus L-Arginin freigesetzt. Bei den dafür verantwortlichen Enzymen handelt es sich um Dioxygenasen, die als NO-Synthasen (NOS) bezeichnet werden.

Man kennt heute drei Typen der NOS: **NOS-I**

NOS-II

NOS-III

Typ I und III sind konstitutive Enzyme und werden auch unter dem Begriff cNOS zusammengefaßt. Charakteristisch für die cNOS ist eine Aktivierbarkeit durch hohe intrazelluläre Ca²⁺-Ionen-Konzentrationen, die über Bindung von Calmodulin am Enzym vermittelt wird.

Vertreten sind die beiden cNOS-Formen in verschiedenen Geweben: NOS-I läßt sich aus Kleinhirnzellen isolieren, während NOS-III im Endothel nachweisbar ist. Beide Formen kommen aber auch in anderen Geweben in unterschiedlichen Konzentrationen vor.

Die NOS Typ II ist dagegen ein induzierbares Enzym (iNOS), das aus Makrophagen isoliert werden konnte. Aktiviert wird die iNOS wird über eine Induktion der Transkription durch Endotoxine, Zytokine oder andere Substanzen. Der zeitliche Bedarf für die Aktivierung liegt bei mehreren Stunden, während die cNOS über Ca²⁺-Ionen binnen weniger Sekunden aktiviert werden kann. Gehemmt werden kann die Expression der iNOS durch Kortikosteroide und Zytokine.

Die Eigenschaften der einzelnen NOS-Formen sind in der nachfolgenden Tabelle noch einmal zusammengefaßt:

	Nachweis in	Expression	Regulation	Aktivierungszeit
NOS I	Kleinhirn, u. v. a.	konstitutiv (cNOS)	Ca ²⁺ Calmodulin	Sekunden, Minuten
NOS II	Makrophagen Granulozyten	induktiv (iNOS)	Zytokine Endotoxine	Stunden
NOS III	Endothel, u. v. a.	konstitutiv (cNOS)	Ca ²⁺ Calmodulin	Sekunden, Minuten

Tab. 1: Eigenschaften der einzelnen NOS-Typen

Das Hauptprodukt, das durch die NOS gebildet wird, ist das Stickstoffmonoxid. Die NOS wandelt L-Arginin in NO und Citrullin um. Dabei werden Sauerstoff und NADPH verbraucht:

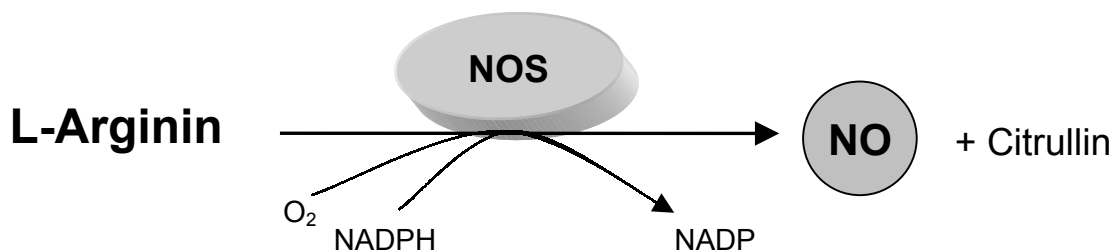


Abb. 2: Bildung von NO aus L-Arginin

Neben NO fallen aber auch noch andere Stickstoffverbindungen an. Dies sind vor allem NO₂, N₂O₂, NO₂⁻ und NO₃⁻.

Gehemmt werden kann die Aktivität der NOS durch Strukturanaloga des Substrates L-Arginin. Durch die strukturelle Ähnlichkeit zu L-Arginin kommt es zu einer kompetitiven, reversiblen Hemmung des Enzyms. Zu solchen Hemmstoffen zählen unter anderem:

- N^o-Monomethyl-L-Arginin (=L-NMMA)
- N^o-Nitro-L-Arginin-Methylester
- N^o-Nitro-L-Arginin
- N^o-Methyl-L-Arginin

1.2.3. Einfluß von NO auf die Funktion der Niere

Wie oben bereits erwähnt, spielt NO in zahlreichen Geweben und Organen eine wichtige Rolle. In dieser Studie interessiert vorwiegend, welche Funktion NO im akuten Nierenversagen hat.

1.2.3.1. Orte der NO-Synthese in der Niere

In verschiedenen Experimenten konnte gezeigt werden, daß die Produktion von NO in der Niere an bestimmte Strukturen gebunden ist. Entsprechend kann mittels immunhistochemischer Verfahren eine spezifische Verteilung der einzelnen NOS-Formen nachgewiesen werden ^[19-21]:

cNOS	iNOS
Macula densa	mesangiale Zellen
	prox. Tubulus
	Sammelrohre
	glomeruläre Endothelien
	Gefäßendothelien renaler Gefäße (v.a. Vasa afferentia und efferentia)

Tab. 2: Verteilungsmuster der NOS in der Niere

Weiterhin weiß man, daß die iNOS eine höhere Aktivität als die cNOS aufweist. Daraus folgt, daß die NO-Produktion im Markbereich, wo ja fast ausschließlich die iNOS in den tubulären Zellen zu finden ist, besonders hoch ist ^[22]. Untersuchungen von Ruilope et al. zeigen, daß die Bildung von cGMP im inneren Markbereich am höchsten ist und nach außen hin abnimmt ^[23].

1.2.3.2. Spezielle Wirkungen von NO in der Niere

Als vaskuläres Hauptziel der NO-Wirkung in der Niere gelten das Vas afferens und die Mesangiumzellen [24]. Die dadurch vermittelten Effekte sind eine Vasodilatation mit nachfolgend erhöhtem RBF im Glomerulum und eine Erhöhung des Ultrafiltrationskoeffizienten K_f . Diese beiden Mechanismen wirken synergistisch und erhöhen die GFR und den Urinfluß.

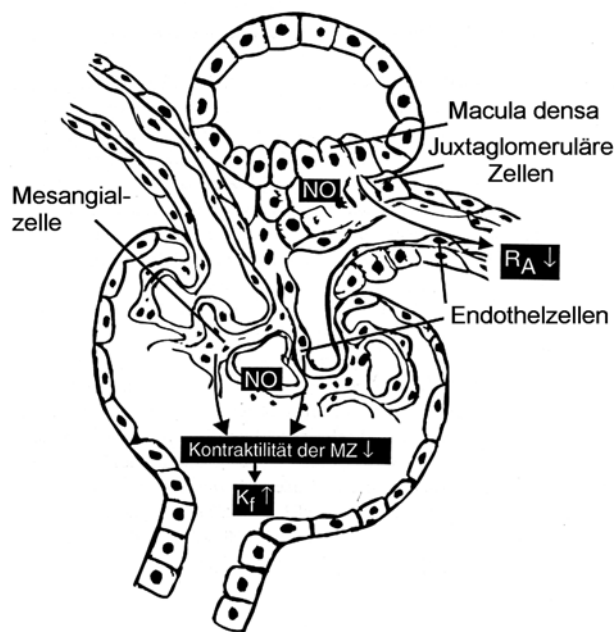


Abb. 3: Auswirkungen der renalen NO-Bildung auf das Glomerulum

Durch den Angriff am Vas afferens und anderen renalen Gefäßen ist eine der wesentlichen Funktionen, die NO in der Niere erfüllt, die Regulation der renalen Durchblutung. Es konnte in mehreren Studien gezeigt werden, dass NO eine dilatierende Wirkung auf die afferente und efferente Arteriole des Glomerulums hat. Unter physiologischen Bedingungen ist dieser Effekt v.a. im Bereich des Vas afferens ausgeprägt. Hierdurch beeinflusst NO im weiteren den glomerulären Filtrationsdruck und damit den Urinfluß und die GFR. Dies läßt sich experimentell bestätigen, indem ein NOS-Inhibitor verabreicht wird. Durch die Hemmung der NOS kommt es zu einem Abfall der GFR, der durch Gabe von L-Arginin im Überschuß aufhebbar ist [25, 26]. Eine alleinige Gabe von L-Arg führt zunächst zu einer kurzzeitigen Vasokonstriktion, dann aber zu einer deutlichen Dilatation der renalen Gefäße [27, 28]. Auf dieser Basis vermutet

man auch, daß eine ständige Synthese von NO dazu beiträgt, einen relativ geringen Gefäßtonus und einen damit verbundenen hohen basalen RBF aufrecht zu erhalten.

NO, welches den Gefäßtonus der afferenten Arteriole reguliert, wird vermutlich auch in der Makula densa gebildet. Untersuchungen von Ito et al. zeigen, daß eine durch L-NMMA verursachte Vasokonstriktion des Vas afferens durch Perfusion der Makula densa mit einer niedermolaren NaCl-Lösung aufgehoben werden kann ^[29].

Stickstoffmonoxid beeinflusst auch die Mesangialzellen. So zeigten verschiedene Arbeiten, daß NO den Tonus der Mesangialzellen vermindert. Durch die Relaxation vergrößert sich die Oberfläche der Basalmembran im Glomerulum. Die Folge ist eine Erhöhung des Ultrafiltrationskoeffizienten K_f mit nachfolgender Zunahme der GFR ^[30-32].

In verschiedenen Studien konnte außerdem ein Einfluß von NO auf die exkretorische Funktion der Niere gezeigt werden. So konnte die Arbeitsgruppe von Rademacher et al. eine NO-Wirkung auf die Na-Exkretion und auf die Glukoseresorption der Tubuluszellen nachweisen ^[33].

1.2.3.3. Effekte von NO im akuten ischämischen Nierenversagen

Die Effekte, die NO im ischämischen ANV zugesprochen werden, werden auf eine ischämische Schädigung der Tubuluszellen mit nachfolgender verminderter NO-Synthese zurückgeführt. Neben dieser Annahme gibt es auch Arbeiten, die einen Anstieg der NO-Synthese zeigen ^[22]. Erklärt wird dieser Anstieg durch einen ischämisch bedingten Ca^{2+} -Einstrom in die Zelle, wodurch es zu einer Aktivierung der cNOS kommt.

Desweiteren kommt es im Rahmen der hypoxischen Schädigung zu einer Leukozyteninfiltration. Die Leukozyten exprimieren selbst iNOS und induzieren gleichzeitig über Zytokine die iNOS-Expression im Gewebe ^[34]. Die Autoren vermuten, daß NO als Folge dieser Mechanismen zwar vermehrt gebildet wird, aber die Sensibilität gegenüber NO im Gewebe reduziert ist.

Letztendlich kommt es zu einem Wegfall NO-vermittelter Effekte und damit zu einer Imbalance zwischen vasokonstriktorischen Faktoren (Endothelin, Angiotensin II) und vasodilatatorischen Einflüssen, zu denen NO als eine der potentesten vasodilatatorischen Substanzen zählt ^[35, 36].

Durch die verminderte NO-Freisetzung wird auch die Wirksamkeit von ACh und Bradykinin vermindert ^[37, 38]. Resultierend kommt es erhöhten Empfindlichkeit des

Nierengewebes auf vasokonstriktorisches Reize, welche als paradoxe Vasokonstriktion bezeichnet wird. Als Folge wird der RBF weiter reduziert und damit auch die GFR. Dieser Mechanismus konnte in Arbeiten von Cristol et al. bestätigt werden, in denen während der postischämischen Phase ein Abfall des RBF bei gleichzeitigem Anstieg des renal vaskulären Widerstandes (RVR) nachgewiesen wurde^[38].

Neben dem Verlust der vasodilatierenden NO-Wirkungen, diskutiert man auch den Ausfall von NO als Radikalfänger. Für die Bildung von NO aus L-Arginin wird ein Sauerstoffatom benötigt. Somit können in dieser Reaktion freie Sauerstoffradikale verbraucht werden^[22]. Allerdings muß hier auch erwähnt werden, daß NO selbst eine sehr reaktive Verbindung ist und mit OH⁻ oder Superoxid-Ionen reagieren kann. Dabei entsteht Peroxynitrit, das eine zellschädigende Wirkung besitzt^[15]. Diese Effekte sind jedoch, verglichen mit dem Wegfall der vasodilatatorischen Wirkung, weit weniger schädlich.

Man nimmt außerdem an, daß durch hohe NO-Spiegel eine NO-abhängige Hemmung eisenhaltiger Enzyme verursacht wird^[18]. Diese Enzyme sind für zahlreiche essentielle Stoffwechselforgänge verantwortlich, so daß eine solche Hemmung zu einer gestörten Zellfunktion führen würde. Besonders betroffen sind die davon DNA-Synthese und die Mitochondrienfunktion^[39].

Ein weiterer wichtiger Gesichtspunkt ist die Wirkung von NO auf die neutrophile Granulozyten: Es ist bekannt, daß NO die Adhäsion dieser Zellen moduliert^[40]. Ein Fehlen der NO-Wirkung führt zu einer erhöhten Adhäsion von Leukozyten am Endothel und zu einer damit verbundenen Schädigung^[22].

Während die Effekte von NO im toxischen Nierenversagen als eindeutig positiv bezeichnet werden können, herrscht hier beim ischämischen Nierenversagen noch eine kontroverse Diskussion. Aufgrund der oben genannten unterschiedlichen Modelle der NO-Wirkung im akuten ischämischen Nierenversagen, kann eine Steigerung der NO-Synthese, z.B. durch Verabreichung des Precursors L-Arginin, eine Verbesserung der Nierenfunktion auslösen^[31]. Andere Arbeiten zeigen jedoch auch eine Verstärkung der Schäden während der Reperfusionphase durch Gabe von L-Arginin.^[38] Hierfür wird die Bildung von Radikalen verantwortlich gemacht.

1.2.3.4. Einfluß von NO auf das Renin-Angiotensin-Aldosteronsystem

In zahlreichen Untersuchungen konnte gezeigt werden, daß zwischen NO und dem Renin-Angiotensin-Aldosteronsystem (RAAS) in der Niere ein enger Zusammenhang

besteht. Durch den Einfluß von Angiotensin-II wird eine verstärkte NO-Freisetzung induziert ^[41-44]. Man diskutiert im wesentlichen zwei Mechanismen, über die diese NO-Stimulation ausgelöst werden kann:

Untersuchungen von Siragy, Tojo und DeNicola zeigen eine direkte Stimulation der NO-Freisetzung durch Angiotensin-II mittels AT₂-Rezeptoren. Eine Beteiligung von AT₁-Rezeptoren konnte ausgeschlossen werden ^[24, 32, 44]. Dieser Mechanismus ist jedoch abhängig von einem aktivierten RAAS ^[44].

Der zweite Mechanismus erfolgt indirekt über die systemische Wirkung von Angiotensin-II: Durch die vasokonstriktorische Wirkung kommt es zu einem Anstieg des Gefäßwiderstandes und des Blutdruckes. Diese Veränderungen führen zu vermehrten Scherkräften, die auf das Endothel einwirken. Als Folge dieser Scherkräfte wird dann vermehrt NO freigesetzt ^[41, 42, 45].

Umgekehrt beeinflusst wiederum NO das Renin-Angiotensin-Aldosteronsystem. So konnte gezeigt werden, daß infolge hoher NO-Konzentrationen die Freisetzung von Renin in der Niere reduziert wird. Als Vermittler dieser Regulation dient die durch NO induzierte Bildung von cGMP ^[24, 29, 46, 47]. Als Folge der verminderten Reninfreisetzung wird letztendlich auch die Angiotensin-II-Bildung herabgesetzt.

Faßt man diese Mechanismen zusammen, läßt sich daraus folgender Regelkreislauf für das Zusammenspiel von NO und dem RAAS in der Niere konstruieren:

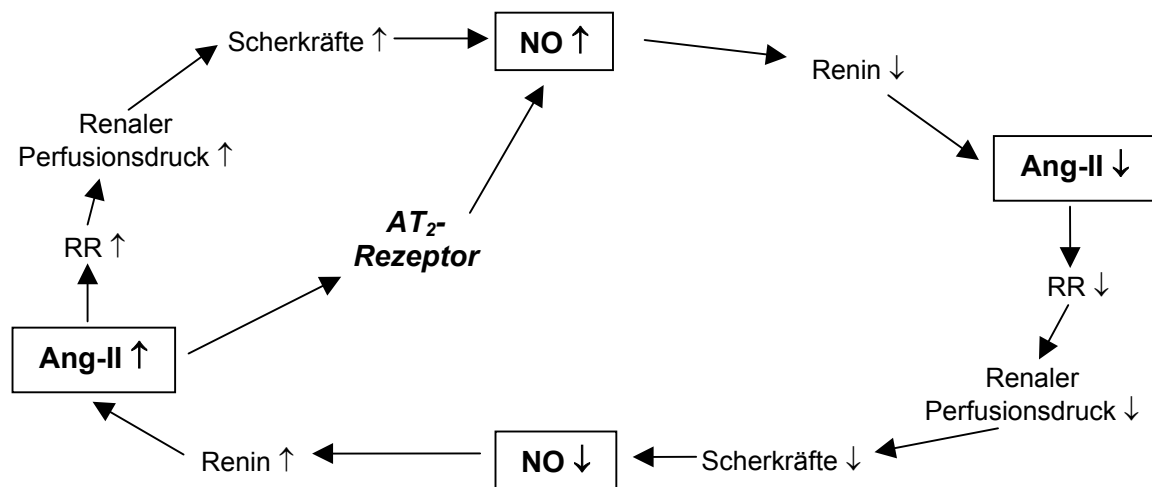


Abb. 4: Regelkreislauf zwischen NO und Angiotensin-II

1.3. Das Medikament Losartan

Losartan ist eine Substanz aus der Gruppe der selektiven AT₁-Rezeptor-Antagonisten. Eine wesentliche Rolle spielt Losartan damit bei der Erforschung der Angiotensin-Rezeptoren (AT-Rezeptoren). Weiterhin war es eine der ersten Substanzen dieser Gruppe, die als Antihypertensivum im klinischen Gebrauch zum Einsatz kamen.

Über die Blockade der Angiotensin-II-Rezeptoren wird eine Unterbrechung des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems (RAAS) erreicht und dadurch eine Blutdrucksenkung induziert. Im Gegensatz zu den ACE-Hemmern, die ebenfalls in das RAAS eingreifen, ist Losartan bei vergleichbarer Wirkung wesentlich besser verträglich. Als einzige häufiger auftretende Nebenwirkung ist leichter Schwindel oder eine leichte Benommenheit bekannt ^[33].

1.3.1. Pharmakologische Daten

Losartan ist eine nicht-peptidische Verbindung. Es bindet spezifisch und kompetitiv an die AT₁-Rezeptoren. Die Struktur ist in der nachfolgenden Strukturformel wiedergegeben:

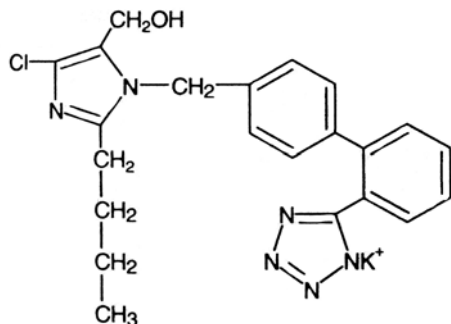


Abb. 5: Strukturformel Losartan

Die Substanz ist oral gut resorbierbar. Die Bioverfügbarkeit liegt bei etwa 33%, da die Resorption einem First-pass-Effekt unterliegt. Durch gleichzeitige Nahrungsaufnahme wird die Resorption jedoch nicht wesentlich beeinflusst ^[48, 49].

Im Blut wird Losartan zu über 98% an Plasmaproteine gebunden transportiert ^[49]. Das Verteilungsvolumen der Substanz beträgt etwa 34 l ^[48, 49].

Losartan wird in der Leber enzymatisch carboxyliert. Das verantwortliche Enzymsystem ist das Cytochrom-P450 (CYP), genauer CYP2C9 ^[50]. Neben inaktiver Metaboliten entsteht zu 14% ein aktiver Metabolit, der als E3174 bezeichnet wird ^[51]. Während Losartan kompetitiv an den AT₁-Rezeptor bindet, ist E3174 ein nicht-kompetitiver Antagonist. Auch der Metabolit ist im Plasma überwiegend an Proteine gebunden und weist ein Verteilungsvolumen von 12 l auf ^[33].

E3174 ist wesentlich für die Wirkung von Losartan verantwortlich, da er ca. 15-20fach stärker wirksam ist als die Ursprungssubstanz Losartan ^[51]. So werden die höchsten Plasmakonzentrationen von E3174 bei einer Einmalgabe von Losartan nach ca. 3-4 Stunden gemessen, während die höchsten Spiegel von Losartan bereits nach 1 Stunde erreicht sind ^[52].

Auch die Eliminationshalbwertszeiten beider Verbindungen unterscheiden sich deutlich: Losartan hat eine Halbwertszeit von 2,1 h, E3174 von 6,4 h ^[33, 52]. Durch die Bildung dieses Metaboliten wird also die Wirkung von Losartan wesentlich verlängert;

dies ist auch in der klinischen Anwendung von großer Bedeutung, da eine einmalige Einnahme für 24 h ausreichend ist.

Die Ausscheidung von Losartan und seiner Metabolite erfolgt sowohl renal als auch biliär. Zu etwa 35% erfolgt die Ausscheidung über den Urin, zu 65% biliär über den Stuhl. Bei normaler Nierenfunktion werden dabei weniger als 5% der aufgenommenen Losartandosis unverändert renal ausgeschieden. Bei Patienten mit deutlich eingeschränkter Nierenfunktion kann eine verringerte Ausscheidungsclearance gemessen werden. Klinisch ist diese Einschränkung für die Ausscheidung jedoch nicht von Bedeutung. Allerdings zeigt sich bei Patienten mit einer mittelgradigen alkoholbedingten Leberzirrhose eine 5fach gesteigerte Plasmakonzentration von Losartan, während die Konzentrationen von E3174 nur auf das 1,7fache ansteigen. [33, 48, 49, 53]

1.3.2. Wirkungsmechanismus und Wirkungen von Losartan

Wie bereits erwähnt gehört Losartan in die Gruppe der selektiven Angiotensin-II-Rezeptor-Antagonisten. Von diesen Rezeptoren sind zwei Subtypen bekannt: Die AT₁-Rezeptoren und die AT₂-Rezeptoren. Diese Subtypen konnten erstmals bei Ratten nachgewiesen werden [54, 55], mittlerweile ist auch deren Vorhandensein beim Menschen bewiesen [56].

Für Losartan ist bekannt, daß die Affinität zu AT₁-Rezeptoren ca. 10000fach größer ist als zu AT₂-Rezeptoren [57]. Damit kann Losartan als selektiver AT₁-Antagonist bezeichnet werden. Agonistische Wirkungen konnten nicht nachgewiesen werden [58].

Die Bindung von Losartan an den Rezeptor erfolgt kompetitiv. Sie ist somit reversibel und weist eine Sättigungskinetik auf [33, 59]. Im Gegensatz dazu bindet der in der Leber gebildete Metabolit E3174 nicht-kompetitiv und hat eine wesentlich höhere Affinität zum AT₁-Rezeptor als Losartan selbst. Dadurch ist die durch den Metaboliten vermittelte Wirkung ca. 15-20 mal stärker als die durch Losartan [33, 51]. Auch E3174 blockiert den AT₁-Rezeptor und weist keinerlei agonistische Aktivität auf.

Die Wirkung von Losartan im Organismus beruht letztendlich darauf, daß durch Losartan selbst und durch seinen aktiven Metaboliten die AT₁-Rezeptoren blockiert werden. Diese AT₁-Rezeptoren befinden sich vor allem in Gefäßendothelien und Herzmuskelgewebe. Aber auch in Gehirn, Niere und Nebenniere, hier v. a. im Bereich der Zona glomerulosa (Sekretionsort von Aldosteron), konnten diese Rezeptoren

nachgewiesen werden ^[60]. Diese Rezeptoren dienen als Bindungsstelle für Angiotensin-II und vermitteln die typischen Wirkungen von Angiotensin-II:

- **Vasokonstriktion der Arteriolen**
- **Freisetzung von Aldosteron aus der Nebennierenrinde**
(damit verbunden ist eine aldosteronabhängige Na-Retention)
- **antinatriuretischer Effekt mit Natrium- und Flüssigkeitsretention infolge direkter Wirkung an der Niere**

Weiterhin lassen sich auch in anderen Geweben Effekte nachweisen, die durch Angiotensin-II über die AT₁-Rezeptoren vermittelt werden. Dazu zählen eine positiv inotrope Wirkung und Beeinflussung der linksventrikulären Funktion des Herzens, eine Steigerung der sympathischen Tonus und eine Induktion des Zellwachstums ^[60].

Durch eine selektive Blockade dieser AT₁-Rezeptoren werden die genannten Wirkungen von Angiotensin-II aufgehoben. Auf diese Weise lassen sich eine Senkung des Blutdrucks sowie günstige Effekte auf das Zellwachstum erreichen, was vor allem im klinischen Einsatz von Bedeutung ist. Im Gegensatz zu den ACE-Hemmern, die durch eine Hemmung der Umwandlung von Angiotensin-I zu Angiotensin-II ebenfalls in das RAAS eingreifen, ist die Wirkung von AT₁-Blockern unabhängig vom Angiotensinspiegel, da diese den Zielrezeptor von Angiotensin-II blockieren.

Auch der andere Subtyp, die AT₂-Rezeptoren kommen beim Menschen vor. Untersuchungen, bei denen diese Rezeptoren selektiv blockiert wurden, zeigten, daß die AT₂-Rezeptoren bei der Vermittlung der Angiotensin-II-typischen Wirkungen keine Rolle spielen ^[61].

Konkret werden durch eine Blockade der AT₁-Rezeptoren durch Losartan im Organismus folgende Wirkungen erreicht:

Seine Auswirkungen auf das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS) führen in erster Linie zu einem reaktiven Anstieg der Plasma-Renin-Aktivität und der Angiotensin-II-Spiegel. Die Aldosteronspiegel fallen als Folge der Blockade ab; dieser Effekt zeigt sich vor allem bei längerer Applikation von Losartan ^[62, 63].

Da Angiotensin-II als einer der stärksten Vasokonstriktoren gilt, kommt es zu einer Dilatation der Arteriolen und damit zu einem Abfall des peripheren Widerstandes. In Folge dessen sinken sowohl der systolische als auch der diastolische Blutdruckwert ab ^[33].

Die Nierenfunktion wird durch die Gabe von Losartan nicht beeinträchtigt. So blieben bei nierengesunden Patienten die glomeruläre Filtrationsrate, der renale Plasmafluß, und das Urinvolumen unverändert ^[64]. Auch die Elektrolytausscheidung wurde nicht wesentlich beeinflusst. Bei Patienten mit bestehender Niereninsuffizienz kam es zu keiner Verschlechterung der Kreatinin-Clearance unter der Einnahme von Losartan ^[65, 66]. Desweiteren konnte eine Verminderung einer bestehenden Proteinurie nachgewiesen werden ^[65]. Diese Beobachtungen vermitteln den Eindruck, Losartan könne eine protektive Wirkung auf die Niere haben; zumindest kommt es durch Losartan zu keiner Schädigung oder Einschränkung der Nierenfunktion.

Bei Patienten mit Hypertonie, bei denen es zu einer linksventrikulären Hypertrophie gekommen ist, konnte gezeigt werden, daß die Gabe von Losartan diese Hypertrophie günstig beeinflusst und sogar eine Rückbildung erreichen kann ^[67].

Im Gegensatz zu den ACE-Hemmern, die zu einem Anstieg des Bradykininspiegels führen und somit eine Verstärkung ihrer vasodilatatorischen Wirkung verursachen, kommt es durch die Blockade von AT₁-Rezeptoren über längere Zeit eher zu einem Absinken des Bradykininspiegels. Damit kann eine solche Verstärkung der durch Losartan vermittelten Vasodilatation ausgeschlossen werden ^[33].

1.4. Fragestellung

In vorliegender Arbeit soll der Einfluß von Losartan auf das L-Arginin/NO-System im akuten ischämischen Nierenversagen der Ratte untersucht werden.

Es ist bekannt, daß es im akuten Nierenversagen zu einer Aktivierung des RAAS kommt. Als Folge dessen kommt es zu einer Vasokonstriktion, wodurch die Durchblutung der Niere weiter verschlechtert wird. Durch die Applikation eines AT₁-Antagonisten wird versucht, den vasokonstriktorischen Effekt von Angiotensin-II abzublocken. Man erhofft sich, so eine Verbesserung der Nierendurchblutung und damit der GFR zu erreichen.

Weiterhin weiß man, daß auch die Synthese von NO im ANV vermindert wird. Deshalb wird Losartan mit L-Arginin kombiniert, aus dem durch die NO-Synthetase NO abgespalten wird, das wiederum eine vasodilatatorische Wirkung hat. Durch die Kombination mit Losartan erwarten wir eine zusätzliche Verbesserung der GFR infolge der verstärkten Vasodilatation.

Desweiteren wird Losartan mit L-NMMA kombiniert, um herauszufinden, wie dadurch die Effekte, die sich aus der AT₁-Blockade mit Losartan ergeben, beeinflusst werden.

Da L-NMMA die NO-Synthese hemmt, erwarten wir hier eine Verminderung des Effektes von Losartan auf die Nierendurchblutung. Entsprechend dieser Überlegung müßte die GFR dadurch wieder abnehmen.

Während der Versuche wird besonders auf das Verhalten von GFR, RPF, Urinzeitvolumen, Filtrationsfraktion, mittlerem arteriellen Blutdruck und der fraktionellen Exkretion von Natrium geachtet.

2. Methodik

2.1. Versuchstiere und Tierhaltung

Als Versuchstiere dienten weibliche Sprague-Dawley-Ratten der Firma Charles River Wega GmbH. Das Gewicht der Tiere lag bei $242,8 \pm 18,3$ Gramm (Mittelwert \pm SEM). Zur Gewichtsbestimmung wurde eine Waage Typ MP3000 der Firma Chyo, Japan, verwendet.

Die Haltung der Tiere erfolgte unter Standardbedingungen paarweise in einem Käfig. Die Ratten hatten freien Zugang zu Wasser und zu standardisierter Rattendiät (Altromin 1324, Altromin GmbH & Co KG, Lage). Jeweils nach Anlieferung wurde den neuen Tieren eine Äquilibrierungsphase von mindestens 3 Tagen gewährt.

2.2. Präparation der Tiere

2.2.1. Narkose

Die Tiere wurden mit einer fünfprozentigen Thiobarbitallösung (Inactin®-Byk, Fa. BykGulden, Konstanz) narkotisiert. Zur Betäubung wurden dem Tier 2 ml/kg Körpergewicht intraperitoneal injiziert. Die erwünschte Wirkung trat nach etwa 5 Minuten ein.

2.2.2. Lagerung während des Versuches

Um die Körpertemperatur während des Versuches konstant auf 37°C zu halten, wurde das Versuchstier auf einem Wärmetisch vom Typ 12511, Medax, der Firma Nagel GmbH, Kiel, gelagert. Die Kontrolle der Körpertemperatur erfolgte durch intermittierende rektale Messungen mit einem elektronischen Fieberthermometer.

2.2.3. Tracheotomie

Um die Atemwege freizuhalten, wurden die Tiere tracheotomiert. Dies erfolgte in Rückenlage bei überstrecktem Kopf. Es erfolgte eine ca. 10 mm lange Hautinzision in der Regio cervicalis anterior entlang der Medianlinie. Die prätrachealen Haut-, Faszien- und Muskelschichten wurden gespalten. Anschließend wurde die Trachea stumpf unter Schonung der benachbarten Gefäß- und Muskelstränge freipräpariert. Die so freigelegte Trachea wurde mit einer gespreizten Pinzette angehoben und dann mit einer kleinen Schere zwischen zwei Knorpelspangen eröffnet. In die Öffnung wurde ein

unsteriler Polyethylenkatheter (Außendurchmesser: 2 mm, Fa. Portex, England) eingeführt. Dieser Trachealtubus wurde mit einer Ligatur fixiert und zur Verringerung des Totraumvolumens auf ca. 15 mm Länge gekürzt. Neben der Freihaltung der Atemwege wurde so auch ein endotracheales Absaugen mit einem dünnen Plastikschlauch ermöglicht.

2.2.4. Katheterisierung der Arteria und Vena femoralis

Als nächstes erfolgte die Freilegung der Femoralgefäße: Das Bein der Ratte wurde fixiert und über der Leistengegend das Fell entfernt. Der Zugang erfolgte über einen ca. 2 cm langen Einschnitt über dem Gefäßnervenstrang der Leistenbeuge. Anschließend wurde die Arteria und Vena femoralis proximal der Mündung der epigastrischen Gefäße freipräpariert. Die beiden Gefäße wurden aus ihrer Bindegewebshülle befreit und einzeln dargestellt. Um größere Blutverluste bei der Katheterisierung zu vermeiden, wurde die Vena femoralis distal der Punktionsstelle mit einem dünnen Bindfaden abgebunden. Anschließend wurde die Vene von unten auf eine kleine Pinzette aufgeladen und angehoben; durch die so entstandene Spannung wurde die Perfusion gestoppt. Mit einer Gefäßschere wurde das Lumen vorsichtig eröffnet und ein spitz zugeschnittener und dünn ausgezogener Polyethylenkatheter der Fa. Portex, England (Außendurchmesser: 1,0 mm, Innendurchmesser: 0,5mm) wurde ca. 5-7 mm weit vorgeschoben und mit einer Ligatur proximal der Punktionsstelle fixiert. Analog zur Katheterisierung der V. femoralis wurde in die A. femoralis ebenfalls ein Polyethylenkatheter eingelegt.

Über den venösen Katheter wurde kontinuierlich Sterofundin® (Fa. B. Braun) infundiert. Die Infusion erfolgte mit Hilfe eines Perfusors der Fa. B. Braun mit einer Infusionsrate von 1,8 ml/h. Parallel dazu wurde über einen Dreiwegehahn eine Mischung aus FITC-Inulin (6 mg/h; Fa. Bioflor HB, Uppsala, Schweden) und PAH (6 mg/h; Fa. Merck Sharp & Dohme, West Point, USA) in 0,9 % isotoner Kochsalzlösung (Fa. Fresenius, Bad Homburg) mit einer Infusionsgeschwindigkeit von 1,2 ml/h infundiert. Während der Infusionsphase (siehe Versuchsaufbau) wurde die jeweilige Versuchsmedikation anstelle der Sterofundin®-Lösung über den venösen Zugang appliziert.

Der Katheter in der A. femoralis diente einerseits der kontinuierlichen Blutdruckmessung mittels eines Blutdruckmonitors (Hellige Recomed®, Fa. Hellige, Freiburg), andererseits wurden darüber die Blutproben entnommen. Um eine Thrombosierung zu vermeiden wurde der arterielle Katheter vor der Punktion mit Heparin-Natrium (Liquemin®, Hoffmann-La Roche AG, Grenzach-Wyhlen) gespült.

2.2.5. Katheterisierung der Harnblase

Zur Bestimmung der ausgeschiedenen Urinmenge und zur Entnahme von Urinproben wurde ein Blasenkateter gelegt. Nach Entfernung des Fells einer kleinen Hautpartie medio-kranial der Symphyse wurde ein ca. 1,5 cm langer vertikaler Hautschnitt in der Medianebene entlang der Linea alba gemacht. Die Faszien und Muskulatur in diesem Bereich wurden stumpf gespalten und das Peritoneum eröffnet. Nachdem die Harnblase lokalisiert worden war, wurde sie mobilisiert und vorsichtig am kranialen Pol durch eine Schnittinzision eröffnet. In diese Öffnung wurde ein entsprechender Blasenkateter eingelegt und durch eine Ligatur fixiert. Der Blasenkateter bestand aus einem ca. 5 cm langen Polyethylenschlauch (Außendurchmesser: 1 mm), an dessen Spitze eine etwa 0,5 cm lange Manschette aus Polyethylen (Außendurchmesser: 2 mm) aufgesteckt war. Diese Manschette verhinderte ein Herausrutschen des Katheters aus der Blase. Die für die Herstellung des Blasenkateters verwendeten Schläuche stammten ebenfalls von der Firma Portex, England.

Der Katheter konnte an eine 0,2 ml-Glaspipette angeschlossen werden. Auf diese Weise konnte genau die produzierte Urinmenge bestimmt und Urin entnommen werden.

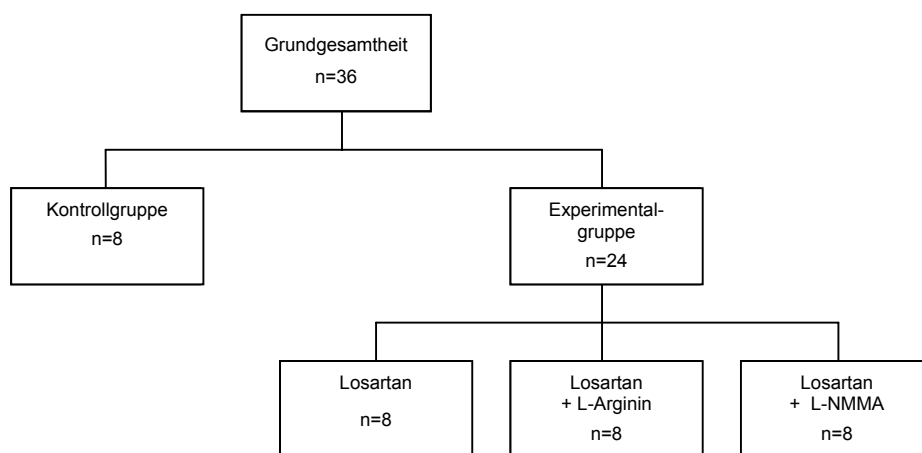
2.2.6. Präparation der Arteriae renales

Um einen ungehinderten Zugang zu den Nierenlagern zu haben, wurden die Tiere in diesem Bereich beidseits paravertebral rasiert. Für die Präparation wurde das Tier in Seitenlage gelagert. Dann erfolgte eine ca. 2 cm lange Hautinzision parallel zur Wirbelsäule. Um Zugang zur Niere zu erhalten, wurde die Muskulatur und das Peritoneum durch einen kleinen Schnitt eröffnet. Die Niere wurde dann vorsichtig unter Verwendung von Wattestäbchen von dem umgebenden Fettlager abgelöst und nach außen bauchwärts auf eine feuchte Kompresse verlagert. An dem nun sichtbaren Gefäßpol wurde die Arteria renales dargestellt und mit einer Markierungsligatur nahe dem Abgang aus der Aorta angeschlungen. Für die Präparation der rechten Arteria renales wurde die linke Niere wieder in den Retroperitonealraum zurückverlagert. Die Präparation der gegenseitigen Nierenarterie erfolgte analog obiger Beschreibung.

2.3. Versuchsaufbau

2.3.1. Gruppeneinteilung

Die 36 Versuchstiere wurden in eine Kontrollgruppe und drei Experimentalgruppen zu jeweils acht Tieren eingeteilt. Die Tiere der Kontrollgruppe erhielten während der Infusionsphase (siehe unten) weiterhin Sterofundin® anstatt einer Medikation. Diese Gruppe diente als Vergleichsgruppe zu den Experimentalgruppen. Die Einteilung wird in nachfolgendem Diagramm noch einmal verdeutlicht:



2.3.2. Versuchsablauf und Versuchsdurchführung

Der gesamte Versuch wurde zeitlich in vier Phasen unterteilt. Weiterhin waren genau die Zeitpunkte zur Probenentnahme vorgegeben. Der im folgenden Diagramm dargestellte Ablauf begann mit Abschluß der Präparation.

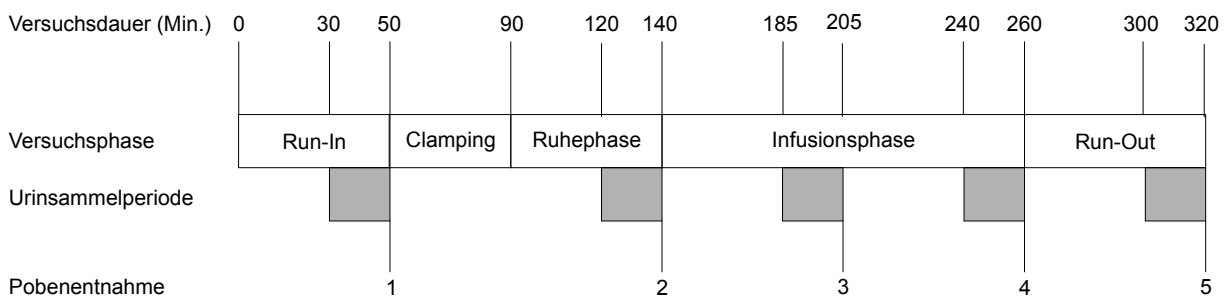


Abb. 6: Versuchsphasen und Probeentnahmen

Run-in: Nach der oben beschriebenen Präparation erfolgte eine 50-minütige Ruhephase, um ein Gleichgewicht zwischen Flüssigkeitszufuhr und -abfuhr zu erreichen.

Clamping: Während dieser Zeit wurden die Aa. renales beidseits mit einer speziellen Arterienklemme für 40 Minuten abgeklemmt. Dadurch wurde die Blutzufuhr unterbrochen und eine ischämische Nierenschädigung induziert.

Ruhephase: Nach Wiederherstellung der Blutzufuhr durch die Entfernung der beiden Arterienklemmen folgte eine 50-minütige Reperfusion der Nieren.

Infusionsphase: Während dieses Versuchsabschnittes wurde den Tieren für 120 Minuten eine entsprechende Versuchsmedikation appliziert. Die Infusionsrate blieb mit 3 ml/h konstant. Die Tiere der Kontrollgruppe erhielten über diesen Zeitraum weiter Sterofundin®.

<u>Versuchsgruppe</u>	Infundierte Versuchsmedikation
Kontrollgruppe	Sterofundin® (Ringer-Laktat 0,9 %)
Losartan	Losartan 0,05 mg/kgKG x h
Losartan + L-Arginin	Losartan 0,05 mg/kgKG x h + L-Arginin 500 mg/kgKG x h
Losartan + L-NMMA	Losartan 0,05 mg/kgKG x h + L-NMMA 1 mg/kgKG x h

Tab. 3: Konzentrationen der infundierten Medikamente

Verwendete Substanzen:

Losartan: Die Substanz wurde uns freundlicherweise von der Fa. MSD Sharp & Dohne, Haar, Deutschland, zur Verfügung gestellt.

L-Arginin: L-Arginin Hydrochlorid, Fa. Sigma, Best.Nr.A 5949

L-NMMA: N ω -Nitro-L-Arginin Methylester Hydrochlorid,
Fa. Sigma, Best.Nr.N 5751

Run-out: Zu Beginn dieser Phase wurde die Versuchsmedikation abgesetzt und wieder allen Gruppen Ringer-Lösung infundiert. Nach 60 Minuten wurden die Tiere durch intravenöse Injektion von 1 ml der fünfprozentigen Thiobarbitallösung eingeschläfert.

In allen Phasen wurde kontinuierlich Ringerlösung (Sterofundin®) und eine Inulin/PAH-Lösung mit einer Geschwindigkeit von 3 ml/h infundiert.

2.4. Probenmaterialien

2.4.1. Probengewinnung

Nach jeweils 50, 140, 205, 260 und 320 Minuten (siehe Abb. 6) erfolgte sowohl eine Blutentnahme als auch eine 20-minütige Urinsammlung. Die Urinsammlung begann entsprechend 20 Minuten vor dem jeweiligen Zeitpunkt. Die in dieser Zeit ausgeschiedene Urinmenge wurde vermerkt und der gewonnene Urin anschließend bei 9000 U/min fünf Minuten lang zentrifugiert (Zentrifuge 5415C, Fa. Eppendorf). Der zellfreie Überstand wurde abpipetiert und für spätere Laboranalysen bei -18°C eingefroren. Als Aufbewahrungsgefäße dienten kleine Glasröhrchen, die sicherstellen sollten, daß während der Lagerung Inulin nicht an Kunststoffe absorbiert wurde.

Zur Gewinnung der Blutproben wurden zum entsprechenden Zeitpunkt ca. 0,5 ml Blut aus dem arteriellen Katheter entnommen. Diese Probe wurde analog den Urinproben aufgearbeitet und eingefroren.

Während des gesamten Versuches wurden außerdem der arterielle Mitteldruck und die Körpertemperatur gemessen und protokolliert.

2.4.2. Aufarbeitung der Probenmaterialien

2.4.2.1. Elektrolyte

Zur Bestimmung der Natrium-Konzentration in Serum und Urin wurde ein Flammenphotometer (FCM 6341, Fa. Eppendorf, Hamburg) des Zentrallabors der Universität Würzburg verwendet. Die fraktionelle Natriumausscheidung (FeNa) wurde nach folgender Formel berechnet:

$$FeNa = \frac{Na_{Urin} [mmol/l] \cdot Urinzeitvolumen [ml/min]}{Na_{Serum} [mmol/l] \cdot GFR [ml/min]}$$

2.4.2.2. Inulin-Bestimmung

Die glomeruläre Filtrationsrate (GFR) wurde über die Bestimmung von Inulin in Serum und Urin ermittelt. Es ist bekannt, daß Inulin im Glomerulum frei filtriert, jedoch in den Tubuluszellen weder rückresorbiert noch sezerniert wird. Daraus ergibt sich, daß die im Urin gemessene Menge an Inulin der pro Zeit filtrierten Menge entspricht. Die glomeruläre Filtrationsrate als Maß für die exkretorische Nierenleistung läßt sich nach folgender Formel berechnen:

$$GFR [ml/min] = \frac{Urinzeitvolumen [ml/min] \cdot Inulin_{Urin} [mg/l]}{Inulin_{Serum} [mg/l]}$$

Um die Inulinkonzentration messen zu können, wurde Fluoreszein-Isothiozyanat markiertes Inulin (FITC-Inulin) verwendet. Mittels dieses an Inulin gekoppelten Farbstoffes konnte die Konzentration von Inulin in Serum und Urin spektralfluorometrisch gemessen werden. Dafür wurde der Fluoreszenzfarbstoff mit einer Wellenlänge von 480 nm (Extinktion) angeregt und die Emission bei 520 nm gemessen. Die Intensität der Emission ist dabei direkt proportional der Inulinkonzentration. Die Proben wurden für die Messung mit einem Fluo-Puffer (5 mM TES, Fa. Sigma, Best. Nr. T1375 und 5 mM MES, Fa. Sigma, Best. Nr. M8250) verdünnt und mit 1 N NaOH auf pH 7,4 eingestellt. Die Serumproben werden in einem Konzentrationsbereich von $1:10^4$ und die Urinproben von $1:10^2 - 1:10^3$ gemessen.

Das Physiologische Institut der Universität Würzburg stellte uns dafür freundlicherweise ein entsprechendes Gerät (SFM 25, Fa. Kontron, Zürich, Schweiz) zur Verfügung.

2.4.2.1. PAH-Bestimmung

PAH wird im Glomerulum frei filtriert und im Tubulus sezerniert. Bei der Nierenpassage wird es praktisch vollständig aus dem Blut eliminiert. Damit stellt die PAH-Clearance ein Maß für den renalen Plasmafluß dar, der sich wie folgt berechnen läßt:

$$RPF [ml / min] = \frac{Urinzeitvolumen. [ml / min] \cdot PAH_{Urin} [mmol / l]}{PAH_{Serum} [mmol / l]}$$

Die PAH-Bestimmung in Serum und Urin erfolgte mittels eines Spektralphotometers bei einer Wellenlänge von 550 nm. Die Proben werden zunächst mit 0,33 M Perchlorsäure verdünnt, um die Proben zu enteiweißen und anschließend nach der Bratton-Marshall-Reaktion in mehreren Arbeitsschritten zu einem stabilen Azofarbstoff weiterverarbeitet. Die Menge des gebildeten Farbstoffes ist der PAH-Konzentration proportional. Die Urinproben werden in einem Konzentrationsbereich von 1:10² und die Serumproben von 1:10 gemessen.

2.5. Statistische Methoden

Für die statistischen Berechnungen wurde das Programm SPSS für Windows V 6.1.3 verwendet.

Mit Hilfe dieser Software wurden folgende Parameter ermittelt:

- **Mittelwert**
- **Standardfehler des Mittelwertes (SEM)**

Weiterhin wurden verschiedene statistische Tests zur Untersuchung auf Unterschiede zwischen den beiden Gruppen mit SPSS durchgeführt:

- **Kolmogorow-Smirnow-Test**
- **t-Test nach Student** (für normalverteilte Werte)
- **U-Test nach Mann und Whitney** (für nicht-normalverteilte Werte)
- **ANOVA** („Analysis of Variance“)

Der Komogorow-Smirnow-Test dient dazu, festzustellen, ob eine Normalverteilung der Werte vorliegt. Nur unter der Voraussetzung, daß die zu untersuchenden Werte normalverteilt sind, darf der t-Test nach Student angewandt werden. Ansonsten

müssen die Berechnungen mit dem U-Test nach Mann und Whitney durchgeführt werden.

Der t-Test nach Student dient dazu, zwei voneinander unabhängige Stichproben (z.B. zwei Medikamentengruppen) zu untersuchen. Es handelt sich dabei um einen sog. Mittelwerttest, d.h. die beiden Gruppen werden hinsichtlich ihres Mittelwertes verglichen, um festzustellen, ob ein signifikanter Unterschied vorliegt.

Der U-Test nach Mann und Whitney basiert auf einem ähnlichen Prinzip, ist jedoch für nicht-normalverteilte Gruppen ausgelegt.

Die Varianzanalyse (Analysis of Variances = ANOVA) ist ein Verfahren, mit dem geprüft werden kann, ob zwei Gruppen aus der gleichen Grundgesamtheit stammen, also gleich sind und sich somit nicht signifikant voneinander unterscheiden. Dieser Vergleich wird mit Hilfe der Berechnung verschiedener Varianzen, also der Abweichung der Einzelwerte vom Mittelwert, bestimmt. Dabei wird sowohl die Abweichung vom Gesamtmittelwert aller zu untersuchenden Gruppen, als auch die Abweichungen der Werte einer Gruppe vom jeweiligen Gruppenmittelwert berechnet. Unter der Voraussetzung, daß die beiden Gruppen aus der gleichen Grundgesamtheit stammen (also sich nicht signifikant voneinander unterscheiden), müßten sich die ermittelten Varianzen nur minimal voneinander unterscheiden. Als Kenngröße dient hierzu der Quotient, der aus beiden Varianzen gebildet wird und der bei gleicher Grundgesamtheit etwa bei 1 liegt. Zur Bestimmung des Signifikanzniveaus, ermittelt SPSS die Wahrscheinlichkeit, daß diese Abweichung von 1 zufällig ist. Wird die Abweichung von 1 zu groß, sinkt die Wahrscheinlichkeit, daß es sich um eine zufällige Abweichung handelt. Mit Unterschreiten des vorgegebenen Signifikanzniveaus muß angenommen werden, daß die beiden zu untersuchenden Gruppen nicht aus der gleichen Grundgesamtheit stammen und sich somit signifikant voneinander unterscheiden.

Zur Bestimmung des Signifikanzniveaus ermittelt man die Irrtumswahrscheinlichkeit p . Das ist die Wahrscheinlichkeit, mit der Nullhypothese (hier: „Die Gruppen sind unterschiedlich“) irrtümlich verworfen wird. Als Grenzwerte galten in der gesamten Arbeit folgende Werte:

Irrtumswahrscheinlichkeit	Bedeutung	Symbolisierung
$p > 0,05$	nicht signifikant	ns
$p \leq 0,05$	signifikant	*

Tab. 4: Grenzwerte der Signifikanzen

Eine Übersicht über die Wahrscheinlichkeitswerte und Signifikanzen der verschiedenen statistischen Tests der vorliegenden Arbeit befindet sich im Anhang.

3. Ergebnisse

3.1. Gewichtsverteilung

Das Gewicht der 32 Versuchstiere vor Versuchsbeginn betrug $244,9 \pm 19,3$ g (MW \pm SEM). Das leichteste Tier wog 211,0 g, das schwerste 289,0 g. Innerhalb der vier Versuchsgruppen unterschied sich die Gewichtsverteilung nicht signifikant (Anova). Folgende Abbildung gibt einen Überblick über die prozentuale Gewichtsverteilung:

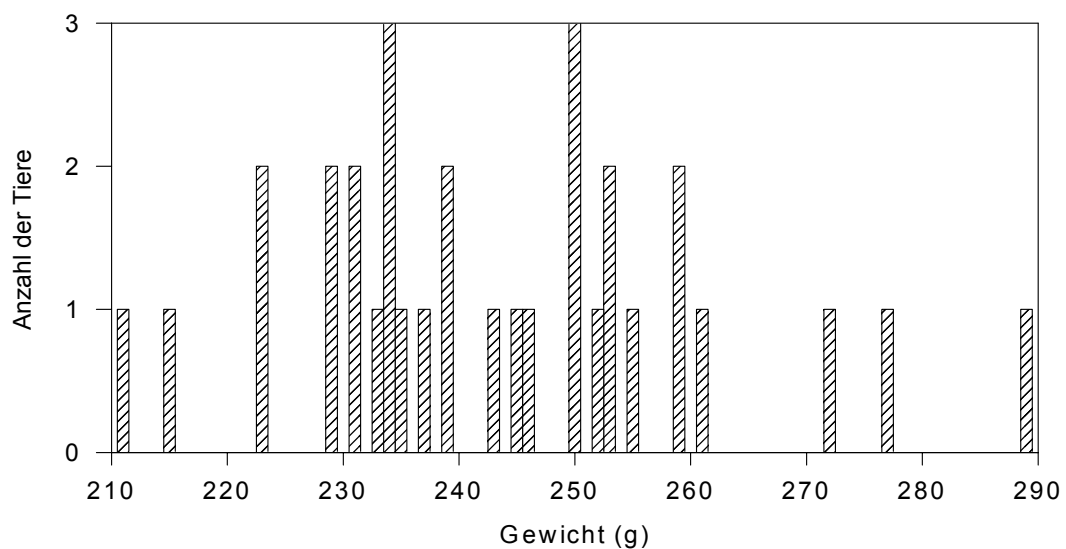


Abb. 7: Gewichtsverteilung der Versuchstiere

3.2. Urinzeitvolumen

Das Urinzeitvolumen wurde mittels einer Glaspipette, die an den Blasenkatheter angehängt wurde, ermittelt. Die Messung erfolgte zu fünf vorgegeben Meßpunkten:

	50 min	120 min	205 min	260 min	320 min
Kontrolle SEM	6,1 2,2	50,2 30,2	29,6 14,4	19,7 ♣ 10,4	15,5 ♣ 9,6
Losartan SEM	6,0 2,8	53,0 52,1	32,5 28,1	15,5 ♣ 9,7	12,6 ♣ 9,0
Losartan + L-Arginin SEM	6,5 1,6	57,2 41,9	42,0 25,5	33,8 18,2	23,5 14,2
Losartan + L-NMMA SEM	6,5 3,2	55,8 39,7	43,2 21,0	42,2 ♣♣ 19,4	36,4 ♣♣ 18,2

Tab. 5: Urinzeitvolumina (MW und SEM) aller Versuchsgruppen in µl/min

- ♣ signifikant gegen Kontrolle
- ♦ signifikant gegen Losartan
- ♥ signifikant gegen Losartan + L-Arg
- ♠ signifikant gegen Losartan + L-NMMA

Während des Run-In's lag die physiologische Urinausscheidung bei 6,1 µl/min (Kontrollgruppe). Sie unterschied sich nicht signifikant von den übrigen Versuchsgruppen. Während der vierzig-minütigen Clampingphase war bei keiner der Gruppen eine Urinproduktion nachweisbar.

Nach Reperfusion der Niere stieg das Urinzeitvolumen auf das acht- bis neunfache des Ausgangswertes an. Die Urinzeitvolumina, die sechzig Minuten nach dem Clamping gemessen werden konnten, waren bei allen Versuchsgruppen in etwa gleich und unterschieden sich auch statistisch nicht signifikant.

Die Volumina fielen dann während der Infusion der jeweiligen Testsubstanz in allen Gruppen kontinuierlich ab. Der stärkste Abfall konnte bei den Tieren der Kontrollgruppe und denen, die Losartan erhalten hatten, beobachtet werden. Der Verlauf dieser beiden Gruppen verhielt sich nahezu identisch: Zunächst wurde ein Wert von 29,6 µl/min bzw. 32,5 µl/min erreicht, der dann in der nächsten Messung weiter auf 19,7 µl/min (Kontrolle) und 15,5 µl/min (Losartan) abfiel.

Die Gruppen, die neben Losartan zusätzlich L-Arginin bzw. L-NMMA erhielten, zeigen einen geringeren Abfall der Urinausscheidung: Hier wird zunächst ein Wert von 42 µl/min und 43,2 µl/min erreicht. In der nächsten Messung differieren die Werte dann deutlich: Das Urinzeitvolumen der Tiere, die Losartan und L-NMMA erhalten haben,

bleibt etwa konstant, während die Urinausscheidung bei Applikation von Losartan und L-Arg weiter abfällt (auf 33,8 $\mu\text{l}/\text{min}$). Ein signifikanter Unterschied bestand in der Messung bei 260 Min. zwischen der Kontrollgruppe und der L-NMMA-Gruppe ($p=0,012$), sowie zwischen den Losartan-Tieren und ebenfalls der L-NMMA-Gruppe ($p=0,016$).

In der abschließenden Messung nach dem Run-Out blieb diese Verteilung ähnlich: Die Endwerte der Kontrolle und der Losartan-Gruppe lagen bei 15,5 $\mu\text{l}/\text{min}$ und 12,6 $\mu\text{l}/\text{min}$ und unterschieden sich nicht signifikant. Der geringste Abfall zeigte sich bei Losartan mit L-NMMA. Hier lag der Endwert bei 36,4 $\mu\text{l}/\text{min}$. Dieser Wert war signifikant höher als der der Losartan-Gruppe ($p=0,021$) und der Kontrollgruppe ($P=0,012$). Die Werte der Tiere, die Losartan und L-Arg erhalten hatten, erreichten am Ende 23,5 $\mu\text{l}/\text{min}$.

Die folgende Abbildung erläutert die Urinvolumina im Versuchsverlauf:

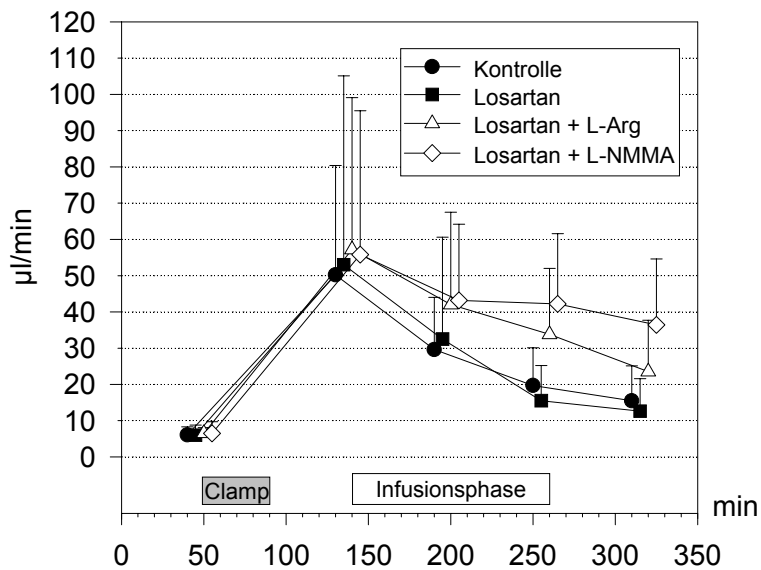


Abb. 8: Urinzeitvolumina aller Versuchsgruppen

3.4. Glomeruläre Filtrationsrate

An allen definierten Meßpunkten wurde die GFR mittels der Inulin-Clearance bestimmt. Zu diesem Zweck wurde jeweils die Inulinkonzentration im Serum und Urin bestimmt und hieraus die GFR berechnet (siehe Kapitel Methodik). Die Mittelwerte der GFR aller Versuchsgruppen zeigt Tabelle 6:

	50 min	120 min	205 min	260 min	320 min
Kontrolle SEM	1,367 0,326	0,152 0,147	0,099 0,060	0,100 ♠ 0,077	0,079 ♠ 0,082
Losartan SEM	1,432 0,103	0,184 0,089	0,110 0,113	0,047 ♥ ♠ 0,035	0,078 ♠ 0,089
Losartan + L-Arginin SEM	1,534 0,486	0,223 0,144	0,198 0,221	0,158 ♠ 0,090	0,170 0,134
Losartan + L-NMMA SEM	1,449 0,228	0,171 0,183	0,289 0,260	0,431 ♠ ♠ 0,370	0,419 ♠ 0,314

Tab. 6: Glomeruläre Filtrationsraten aller Versuchsgruppen in ml/min

- ♠ signifikant gegen Kontrolle
- ♠ signifikant gegen Losartan
- ♥ signifikant gegen Losartan + L-Arg
- ♠ signifikant gegen Losartan + L-NMMA

Zu Beginn des Versuches lag die basale GFR in der Kontrollgruppe bei 1,367 ml/min. Dieser Wert entspricht dem physiologischen Normbereich und spiegelt die normale Nierenfunktion einer Ratte wieder. Bei den drei Experimentalgruppen wurden ähnliche Basalwerte gemessen.

Während des Clampings zeigte sich bei allen Versuchsgruppen ein ausgeprägter Abfall der GFR. Es zeigte sich ein Rückgang auf Werte zwischen 0,152 und 0,223 ml/min., was in etwa einem Abfall um 85 % entspricht. Ein signifikanter Unterschied zwischen den einzelnen Versuchsgruppen bestand nicht.

Bei der ersten Messung während der Infusionsphase ergaben sich nur geringe Veränderungen: Bis auf die Gruppe, die Losartan zusammen mit L-NMMA erhalten hatte, verhielt sich die GFR bei allen anderen Gruppen weiter fallend, wobei sich der Wert nur sehr geringfügig veränderte. Die tiefsten Werte erreichte dabei die Kontrollgruppe.

Bei den Tieren, die zusätzlich L-NMMA erhalten hatten, zeigte sich jedoch ein Anstieg, der während der gesamten Infusionsphase anhielt. Die GFR stieg hier zunächst auf 0,289 ml/min in der Messung bei 205 min., später bei 260 min. weiter auf 0,431 ml/min

(signifikanter Unterschied gegenüber der Kontrollgruppe, $p=0,026$, und gegenüber Losartan, $p=0,044$). Die anderen Gruppen unterschieden sich auch nach 260 Min. nur unwesentlich voneinander, allerdings bestand ein signifikanter Unterschied zwischen den Tieren, die Losartan erhalten hatten und denen, die zusätzlich L-Arginin hatten ($p=0,025$).

Bei Abschluss des Versuches war bei allen Versuchsgruppen keine wesentliche Veränderung mehr zu verzeichnen. Auch unter L-NMMA stagnierte der Anstieg nach der Infusionsphase. Die Endwerte lagen zwischen 0,079 ml/min (Kontrollgruppe) und 0,419 ml/min (Losartan + L-NMMA). Dazwischen lagen die Gruppen Losartan und Losartan + L-Arg. Ein signifikanter Unterschied bestand wieder zwischen der Kontrollgruppe und der L-NMMA-Gruppe ($p=0,010$) sowie zwischen L-NMMA und Losartan ($p=0,039$).

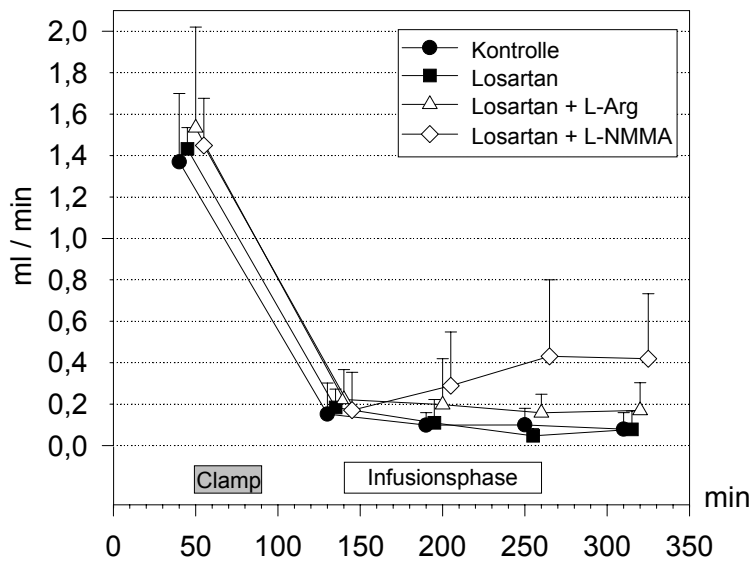


Abb. 9: Glomeruläre Filtrationsraten aller Versuchsgruppen

3.5. Renaler Plasmafluß

Der renale Plasmafluß (RPF) wurde mittels PAH-Clearance bestimmt. An allen definierten Meßpunkten (vgl. Methodik) wurde die PAH-Konzentration im Serum und im Urin bestimmt. Daraus konnte der renale Plasmafluß berechnet werden. Die Ergebnisse sind in untenstehender Tabelle zusammengefaßt:

	50 min	120 min	205 min	260 min	320 min
Kontrolle SEM	5,504 1,607	0,235 0,189	0,154 ♣ 0,168	0,156 ♣ 0,176	0,185 ♥ 0,266
Losartan SEM	6,041 1,564	0,244 0,118	0,148 0,119	0,071 0,063	0,095 ♥ 0,100
Losartan + L-Arginin SEM	8,101 3,586	0,301 0,198	0,326 0,288	0,314 0,254	0,360 ♣♦ 0,320
Losartan + L-NMMA SEM	6,829 1,980	0,381 0,573	0,437 ♣ 0,444	0,581 ♣ 0,532	0,725 0,828

Tab. 7: Renaler Plasmafluß aller Versuchsgruppen in ml/min

- ♣ signifikant gegen Kontrolle
- ♦ signifikant gegen Losartan
- ♥ signifikant gegen Losartan + L-Arg
- ♠ signifikant gegen Losartan + L-NMMA

Zu Beginn des Versuches lag der mittlere renale Plasmafluß aller Versuchsgruppen im physiologischen Normbereich. Während des Clampings fiel der renale Plasmafluß in allen Gruppen auf etwa 5% des Ausgangswertes ab. Signifikante Unterschiede bestanden nicht.

Im weiteren Verlauf des Versuchs veränderten sich die Werte nicht wesentlich. Nach Beginn der Infusion der jeweiligen Versuchsmedikation blieb der RPF etwa im Bereich des Wertes bei der 120-Minuten-Messung. Bei den Gruppen, denen L-Arginin oder L-NMMA verabreicht wurden, zeigte sich ein, wenn auch minimaler, Anstieg. Die Kontrollgruppe und die Losartangruppe fielen mit den Werten ab, wobei die Losartan-Tiere deutlich stärker abfielen. Ein signifikanter Unterschied bestand zwischen der Kontroll- und der L-NMMA-Gruppe ($p=0,0157$).

Nach weiteren 55 Minuten in der Infusionsphase stagnierte der Abfall des RPF bei der Kontrollgruppe bei 0,156 ml/min. Bei den Tieren, die Losartan bzw. Losartan mit L-Arg erhalten hatten fiel der RPF ab, bei der Losartan-Gruppe deutlich (um 53%), bei Losartan mit L-Arg dagegen nur um 6%. In der Gruppe mit L-NMMA stieg der RPF im Mittel weiter an (von 0,437 ml/min auf 0,581 ml/min). Auch zu dieser Versuchsphase

war ein signifikanter Unterschied nur zwischen der Kontrollgruppe und der Gruppe, die Losartan zusammen mit L-NMMA erhalten hatte, nachweisbar ($p=0,0357$).

In der letzten Messung war der RPF der Kontrollgruppe auf 0,185 ml/min angestiegen. Sie unterschied sich damit signifikant von Losartan mit L-Arg ($p=0,0357$). Eine Signifikanz zu L-NMMA konnte am Ende nicht mehr nachgewiesen werden. Die Tiere, denen Losartan zusammen mit L-Arg infundiert wurde, zeigten nach Absetzen der Versuchsmedikation einen Anstieg um 15% (auf 0,360 ml/min); sie unterschieden sich signifikant von der Losartan-Gruppe ($p=0,047$). Auch bei der L-NMMA-Gruppe setzte sich im Run-Out die steigende Tendenz fort, hier sogar um 25%. Im Vergleich zu den vorangegangenen Messungen war nach dem Clamping insgesamt ein relativ konstanter Zuwachs des RPF zu verzeichnen.

Die Ergebnisse sind in folgender Graphik zusammengestellt:

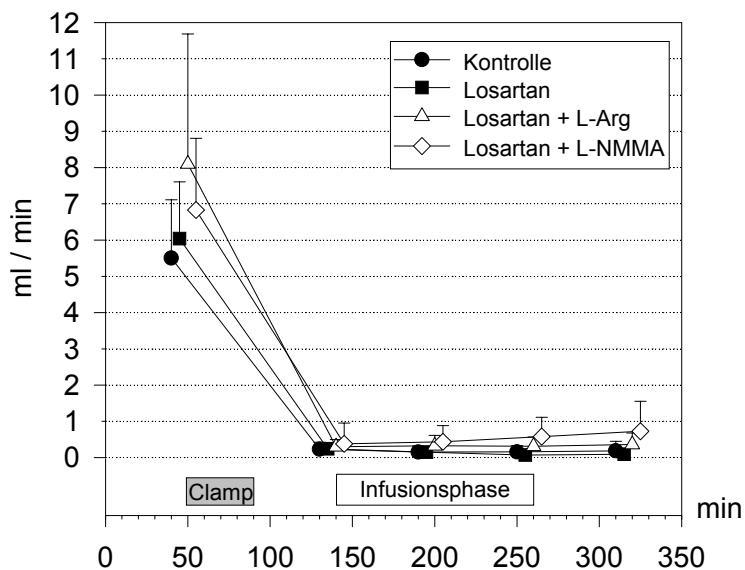


Abb. 10: Renaler Plasmafluß aller Versuchsgruppen

3.6. Renal vaskulärer Widerstand

Den renal vaskulären Widerstand (RVR) berechneten wir aus bereits bestimmten Parametern nach folgender Formel:

$$RVR[kPa \cdot min/cm^3] = \frac{(1 - Hkt) \cdot RR[kPa]}{RPF[cm^3/min]}$$

Tabelle 8 gibt einen Überblick auf die für die definierten Zeitpunkte berechneten Werte des renalen vaskulären Widerstandes:

	50 min	120 min	205 min	260 min	320 min
Kontrolle SEM	2 1	51 30	77 39	105 109	133 109
Losartan SEM	1 0	56 57	114 121	169 140	280 ♣ 150
Losartan + L-Arginin SEM	1 1	53 66	50 45	57 58	58 62
Losartan + L-NMMA SEM	1 1	54 40	115 258	71 152	54 ♦ 105

Tab. 8: Renal vaskuläre Widerstände aller Versuchsgruppen in kPa•min/cm³

- ♣ signifikant gegen Kontrolle
- ♦ signifikant gegen Losartan
- ♥ signifikant gegen Losartan + L-Arg
- ♠ signifikant gegen Losartan + L-NMMA

Zu Versuchsbeginn starteten alle Gruppen mit nahezu identischem Ausgangswert. Durch das Clamping kam es zu einem Anstieg des renal vaskulären Widerstandes auf etwa das 50fache des Ausgangswertes. Diese Veränderung war ebenfalls noch bei allen Gruppen gleichermaßen zu verzeichnen.

Erst mit Beginn der Infusionsphase, verhielten sich einzelne Gruppen unterschiedlich. So zeigte sich bei den Tieren, die neben Losartan auch L-NMMA erhalten, eine deutlicher Anstieg von 54 kPa min/cm³ auf 115 kPa min/cm³ (entspricht 112%) um dann am Ende der Infusionsperiode wieder deutlich zu fallen (Wert bei 260 Min.: 71 kPa min/cm³). Damit lag der RVR am Ende der Infusionsperiode höher als direkt nach dem Clamping.

Auch bei der Kontrollgruppe stieg der RVR weiter an, jedoch nicht so ausgeprägt. Die Losartan-Gruppe stieg in etwa gleichem Maß an, wie die L-NMMA-Tiere, allerdings

setzte sich hier der Anstieg bis zum Ende des Versuches fort. Auch die Tiere der Kontrollgruppe stiegen bis Versuchsende, jedoch nur etwa halb so hoch. Der Anstieg lag insgesamt bei etwa 40%, wobei unter Losartan die Kurve am Ende auf das 5-fache des Wertes nach Clamping anstieg. Hier bestand ein signifikanter Unterschied zu den L-NMMA-Tieren, die zum Versuchsende deutlich abfielen.

Die geringste Veränderung im Vergleich zur zweiten Messung zeigte die L-Arg-Gruppe: Hier blieb der RVR unverändert. Erst mit fortschreitender Infusion der Testsubstanz kam es zu einem minimalen Anstieg, der jedoch so gering war, das eine Konstanz postuliert werden darf. Der Mittelwert blieb schließlich bis über das Run-Out hinaus nahezu unverändert.

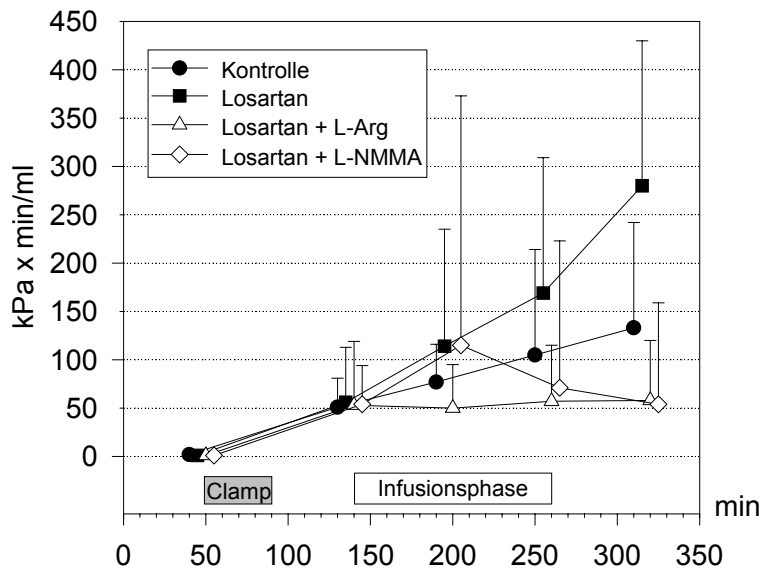


Abb. 11: Renal vaskulärer Widerstand aller Versuchsgruppen

3.7. Filtrationsfraktion

Die Filtrationsfraktion ist definiert als Quotient aus der glomerulären Filtrationsrate und dem renaler Plasmafluß. Sie gibt an, wieviel Prozent des Plasmavolumens, welches durch das Glomerulum fließt, abfiltriert wird und im Primärharn erscheint. Untenstehende Tabelle gibt einen Überblick über die zu definierten Zeiten berechneten Filtrationsfraktionen:

	50 min	120 min	205 min	260 min	320 min
Kontrolle SEM	29 12	74 31	87 21	86 22	80 28
Losartan SEM	25 6	81 23	75 26	81 27	82 17
Losartan + L-Arginin SEM	22 14	78 25	72 34	70 30	63 30
Losartan + L-NMMA SEM	23 8	63 31	74 21	83 21	79 25

Tab. 9: Filtrationsfraktionen aller Versuchsgruppen in %

- ♣ signifikant gegen Kontrolle
- ◆ signifikant gegen Losartan
- ♥ signifikant gegen Losartan + L-Arg
- ♠ signifikant gegen Losartan + L-NMMA

Während der Run-in Phase lagen die Filtrationsfraktionen aller Versuchsgruppen zwischen 20 und 30 %. Nach der Ischämiephase stieg die Filtrationsrate in allen Gruppen eindeutig an. Der Mittelwert der L-NMMA-Gruppe lag hier etwas unterhalb des Bereiches, in dem sich die anderen Gruppen bewegten. Dies darf wohl auf die Tatsache zurückgeführt werden, daß sich die Filtrationsrate aus zwei gemessenen Werten ergibt und sich so die Streuung infolge von Meßungenauigkeiten bei den Einzelwerten potenziert. Da keine signifikanten Unterschiede bestehen und der Anstieg der Werte in einem ähnlichen Größenbereich lag, darf postuliert werden, daß durch das Clamping allein kein Unterschied zwischen den Gruppen besteht.

Erst nach Beginn der Infusionsphase zeigen sich deutlich auseinanderweichende Mittelwerte: Die Kontrollgruppe erreicht beim dritten Meßpunkt den höchsten Mittelwert, nämlich 87% und bleibt bis zur Messung konstant. Auch die Tiere, die Losartan mit L-NMMA erhalten haben steigen während der Infusionsphase an, und zwar in gleichem Maße wie die Filtrationsfraktion der Kontrollgruppe. Bei der dritten Messung liegt der Wert bei 74%, zum Ende der Infusionsphase bei 83%. Berücksichtigt man die leicht

unterschiedlichen Ausgangsmittelwerte nach dem Clamping, darf man annehmen, daß unter L-NMMA bis zum Ende der Infusionsperiode der gleiche Wert wie bei der Kontrollgruppe erreicht wird.

Bei Gabe von Losartan fallen die Werte, die nach dem Clamping bestanden haben, um 8 % ab. Im weiteren Verlauf der Medikamentenphase steigt dann die Filtrationsfraktion bei alleiniger Gabe von Losartan von 75 % auf 81 % an. Auf diesem Level stagnieren die Werte dann schließlich bis zum Ende des Versuches.

Ein kontinuierlicher Abfall der Filtrationsrate zeigt sich nur bei der Applikation von Losartan mit L-Arg. Hier fällt der Mittelwert während der Infusion der Testsubstanz zunächst auf 72% ab und bleibt bis zum Ende der Infusion zunächst stabil (70%). Erst am Ende des Versuchs zeichnet sich ein weiterer Abfall auf 63% ab.

Während des Run-Outs fällt auch die Filtrationsfraktion bei der Kontrollgruppe und bei Losartan mit L-NMMA ab. In diesem Bereich verlaufen diese beiden Kurven nahezu parallel. Die Endwerte sind in allen Gruppen nahezu identisch, mit Ausnahme der Werte von Losartan + L-NMMA

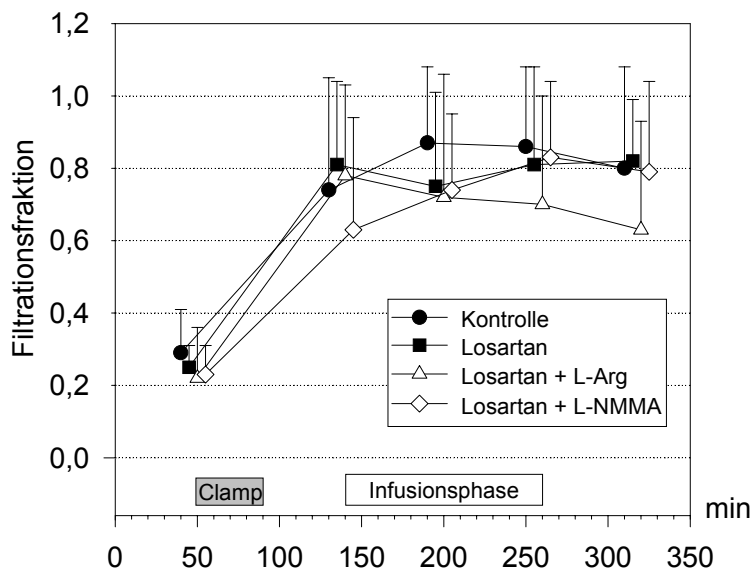


Abb. 12: Filtrationsfraktionen aller Versuchsgruppen

3.8. Fraktionelle Natriumexkretion

Zur Bestimmung der fraktionellen Natriumexkretion (FeNa) wird die Natriumkonzentration in Serum und Urin flammenphotometrisch bestimmt und die fraktionelle Exkretion nach obenstehender Formel (siehe Kapitel Methodik) berechnet. Die FeNa stellt ein Maß für die intrarenalen Tubulusschädigung dar und die dadurch bedingte gestörte Salzurückresorption im Tubulussystem. Sie wird als dimensionslose Prozentzahl angegeben. Die folgende Tabelle gibt die Ergebnisse wieder:

	50 min	120 min	205 min	260 min	320 min
Kontrolle SEM	0,28 0,30	29,98 13,85	27,02 8,51	17,58 4,43	23,32 10,52
Losartan SEM	0,21 0,13	25,62 14,16	43,70 31,26	36,39 ♣ 18,27	30,40 21,98
Losartan + L-Arginin SEM	0,28 0,28	27,76 12,09	33,96 32,45	20,69 7,99	14,77 7,50
Losartan + L-NMMA SEM	0,28 0,23	27,29 13,58	20,83 12,94	16,09 ♦ 13,38	13,23 9,05

Tab. 10: Fraktionelle Natriumexkretion aller Versuchsgruppen in %

- ♣ signifikant gegen Kontrolle
- ♦ signifikant gegen Losartan
- ♥ signifikant gegen Losartan + L-Arg
- ♠ signifikant gegen Losartan + L-NMMA

Der Ausgangswert der fraktionellen Natriumexkretion liegt bei allen Tieren zu Beginn des Versuchs bei etwa 0,3 %. Durch die Abklemmung der Nierenarterie kommt es zu einem Anstieg auf etwa das Hundertfache des Ausgangswertes.

Geht man von einem für alle Gruppen gültigen 120-Minuten-Wert von etwa 27 % aus, kommt es unter Zufuhr der Versuchsmedikation bei der Losartan-Gruppe und unter Zusatz von L-Arg zunächst zu einem Anstieg. Bei den anderen Gruppen fällt die FeNa in etwa gleichem Ausmaß ab. Der höchste Wert in der 205-Minuten-Messung ist in der Losartangruppe zu verzeichnen. Bei 260 Minuten zeigt sich ein signifikanter Unterschied zwischen Losartan und der L-NMMA-Gruppe ($p=0,049$).

Bis zum Ende der Infusionsperiode kommt es dann allerdings bei allen Gruppen zu einem Abfall. Die niedrigsten Werte zeigen die Kontrollgruppe und die L-Arg-Gruppe. Die Tiere, die nur Losartan erhalten hatten, zeigen einen vergleichbaren Rückgang, allerdings auf einem deutlich höheren Niveau.

Diese fallende Tendenz setzt sich dann bis zum Ende des Versuches in allen Gruppen fort. Dabei bleibt die Steilheit der Kurvenverläufe bei Losartan und L-NMMA in etwa gleich, während bei Losartan mit L-Arg mit Ende der Infusionsphase ein langsamerer Rückgang der FeNa eintritt. Auffällig tritt hier die Kontrollgruppe hervor: Hier steigt die fraktionelle Natriumexkretion zum Ende des Versuches sogar noch einmal leicht an.

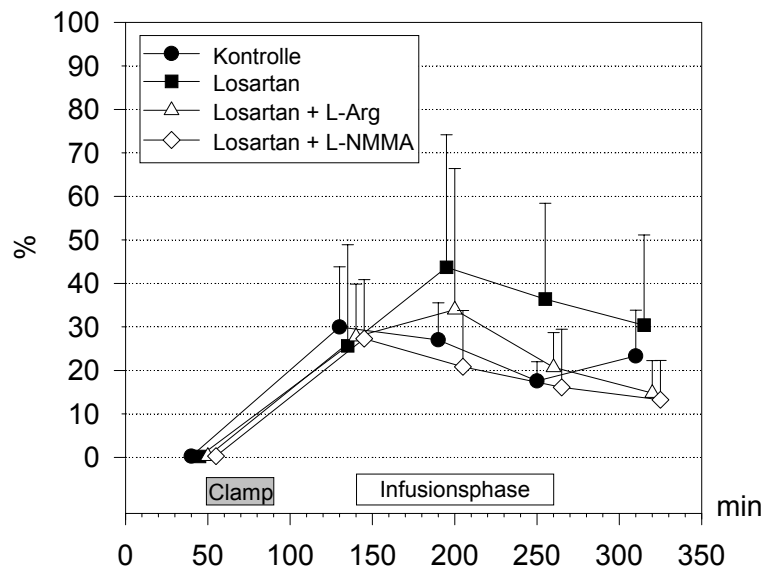


Abb. 13: Fraktionelle Natriumexkretion aller Versuchsgruppen

3.9. Mittlerer arterieller Blutdruck

Über einen Katheter in der Arteria femoralis wurde während des gesamten Versuches der mittlere arterielle Blutdruck (MAP) gemessen. Zusätzlich zu jedem der fünf definierten Abnahmezeitpunkte erfolgte eine Eichung des Gerätes. Tabelle 11 gibt einen Überblick über die gemessenen Werte:

	50 min	120 min	205 min	260 min	320 min
Kontrolle SEM	91 10	104 12	96 14	86 15	79 17
Losartan SEM	84 13	99 10	83 19	71 17	68 11
Losartan + L-Arginin SEM	91 14	101 22	91 21	85 19	77 14
Losartan + L-NMMA SEM	88 18	94 16	92 19	85 16	80 14

Tab. 11: Mittlerer arterieller Blutdruck aller Versuchsgruppen in mmHg

- ♣ signifikant gegen Kontrolle
- ◆ signifikant gegen Losartan
- ♥ signifikant gegen Losartan + L-Arg
- ♠ signifikant gegen Losartan + L-NMMA

Der Ruhewert des arteriellen Mitteldruckes lag bei 90 mmHg, ohne statistisch signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen.

Während und nach der Clamping-Phase stieg in allen Gruppen der mittlere arterielle Blutdruck auf Werte um 100 mmHg an. Unter Applikation der Medikamente fiel der Blutdruck bei allen Gruppen leicht ab, bei der Losartan -Gruppe war dieser Abfall am deutlichsten ausgeprägt, bei L-NMMA am geringsten. Im restlichen Versuch fielen die Drücke kontinuierlich weiter, wobei der Kurvenverlauf von der Steigung bei allen Gruppen dann in etwa gleich war. Mit Ausnahme der Losartan-Tiere lagen die Werte nach dem Run-Out bei ca. 80 mmHg. Bei der Losartan-Gruppe lag der Wert, entsprechend dem deutlicheren Druckverlust zu Beginn der Infusionsphase, um 10 mmHg tiefer.

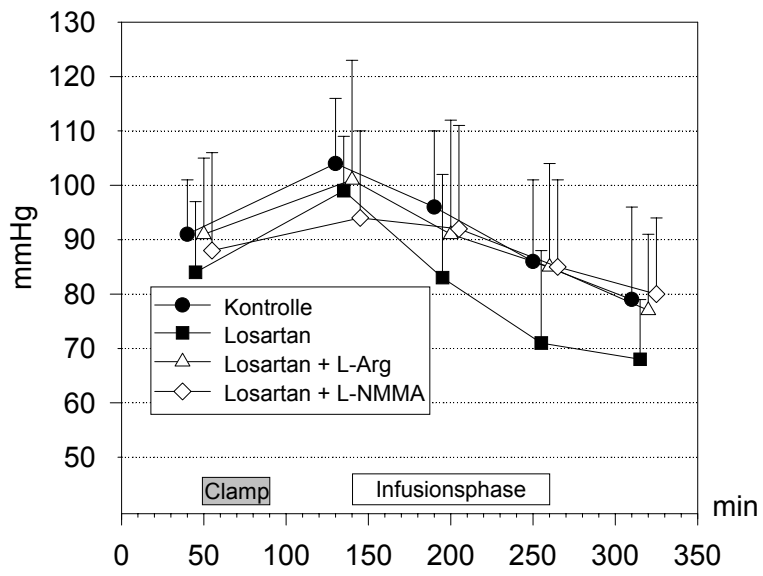


Abb. 14: Mittlerer arterieller Blutdruck aller Versuchsgruppen

4. Diskussion

4.1. Akutes ischämisches Nierenversagen durch Clamping

Das Nierenversagen wurde durch beidseitiges Abklemmen der Aa. renales (Clamping) für 40 Minuten erreicht. Als Folge der fehlenden Durchblutung kommt es zu einer ischämischen Schädigung des Nierengewebes.

Wie bereits in anderen Arbeiten beschrieben, tritt in der Frühphase des akuten Nierenversagens ein rapider Abfall der GFR und des RPF bei einem gleichzeitigen Anstieg des RVR auf ^[22, 31, 38, 68].

Entsprechend konnte 50 Minuten nach Beendigung der Clampingphase bei allen vier Versuchsgruppen ein Abfall der GFR auf durchschnittlich 13,5 % des Basalwertes gemessen werden. Der renale Plasmafluß fiel auf etwa 5 % des Basalwertes ab. Gleichzeitig stieg der RVR bei allen Gruppen um das 20-50-fache des Ausgangswertes an.

Diese charakteristische Konstellation kann durch eine ausgeprägte Vasokonstriktion der renalen Gefäße erklärt werden. Physiologischerweise wird die Nierendurchblutung autoregulatorisch konstant gehalten. NO, das in der Niere v.a. auf die Vasa afferentia und die Mesangiumzellen wirkt ^[24], spielt hierbei eine wesentliche Rolle in der Regulation der Nierendurchblutung ^[31]. Die vasodilatierende Wirkung hält einen ausreichenden RPF aufrecht, die Wirkung von NO auf die Mesangiumzellen beeinflusst den Ultrafiltrationskoeffizienten K_f ; beides zusammen dient der Aufrechterhaltung der GFR ^[30-32].

Als Folge einer ischämischen Nierenschädigung wird eine sog. „paradoxe Vasokonstriktion“ beobachtet. Darunter versteht man eine reaktive Vasokonstriktion bei auftretender Ischämie, wodurch es zu dem oben beschriebenen massiven Anstieg des RVR kommt. Diese Reaktion erklärt man sich durch eine Imbalance zwischen gefäßerweiternden und gefäßverengenden Einflüssen. Als Folge einer ischämiebedingten Schädigung der Tubuluszellen wird die NO-Synthese reduziert und die vasodilatierende Wirkung von NO eliminiert. Gleichzeitig wird im akuten ischämischen Nierenversagen eine verstärkte Freisetzung von vasokonstriktorischen Substanzen (Endothelin, Angiotensin II) beobachtet ^[35, 36], so daß nun vasokonstriktorische Einflüsse überwiegen. Andere Arbeitsgruppen postulieren außerdem eine verminderte Ansprechbarkeit des Gewebes auf NO. So konnten u.a.

Peer et al. 60 Minuten nach Clamping eine signifikant gesteigerte Ausscheidung von Metaboliten des NO-Stoffwechsels nachweisen ^[22]. Daraus folgert er eine gesteigerte NO-Synthese. Eine genauere Differenzierung zeigt eine tatsächlich gesteigerte Aktivität der iNOS bei gleichzeitig verminderter Aktivität der cNOS ^[22]. Peer schließt im Einklang mit der vorliegenden Vasokonstriktion auf eine NO-Resistenz des Gewebes. Auch andere Arbeiten wiesen eine erhöhte Aktivität der NOS nach. Conger geht davon aus, daß diese Aktivitätserhöhung eine Reaktion auf die Vasokonstriktion ist und als Gegenregulation zu werten sei ^[69].

Man kann davon ausgehen, daß es initial als Folge der Ischämie zu einer verminderten NO-Synthese kommt und daß im weiteren Verlauf dann eine verstärkte NOS-Aktivität im Sinne einer Gegenregulation auftritt. Die fehlende NO-Wirkung führt letztendlich zu einer ausgeprägten Vasokonstriktion (v.a. im Bereich der Vasa afferentia) und damit zum Anstieg des RVR. Dadurch kommt es zu einer Abnahme des RPF. Diese verminderte Perfusion der Glomerulums zusammen mit Verminderung des Ultrafiltrationskoeffizienten führt dann zur Abnahme der GFR.

Weiterhin fiel auf, daß es nach der Reperfusion der Nieren zu einer ausgeprägten Polyurie der Tiere kam. Während der Dauer des Clampings war keine Urinproduktion zu beobachten. Dies ist Folge der fehlenden arteriellen Durchblutung der Nieren und diente als Kontrolle für eine vollständige Ischämie der Nieren. Nach Reperfusion beobachtete man in allen Gruppen einen Zuwachs des Urinzeitvolumens auf das acht- bis neunfache des Ausgangswertes. Im weiteren Verlauf des Versuches war das Urinzeitvolumen dann wieder rückläufig, aber im Vergleich zu Beginn immer noch deutlich höher. Gleichzeitig kann bei allen Gruppen ein postischämischer Anstieg der fraktionellen Natriumexkretion von durchschnittlich 0,3 % auf 27 % (Ausnahme Kontrollgruppe: 46 %) verzeichnet werden. Die Ursache für die verstärkte Natriumausscheidung ist auf eine ischämische Schädigung der Ionentransporter in der Niere zurückzuführen. Als Folge dessen kann Natrium nicht mehr in gewohntem Ausmaß rückresorbiert werden und wird vermehrt ausgeschieden. Die hohen Natriumkonzentrationen im Harn führen letztendlich auch zu einem erhöhten Urinzeitvolumen. Dieser Zusammenhang wird durch die Tatsache unterstrichen, daß auch die FENa nach dem Clamping massiv erhöht und dann im weiteren Verlauf rückläufig ist.

Als weiterer Meßparameter steht die Filtrationsfraktion zur Verfügung. Auch hier kommt es nach der Ischämie zu einem deutlichen Zuwachs. Dies weist auf eine Zunahme des

Gefäßwiderstandes der efferenten Arteriolen im Rahmen der überwiegenden vasokonstriktorischen Einflüsse hin.

Der systemische mittlere arterielle Blutdruck, der während des Versuches kontinuierlich gemessen wurde, stieg über die Clampingphase von durchschnittlich 90 mmHg auf etwa 100 mmHg an. Dies ist am ehesten eine sympathische Reaktion auf die Streßsituation. Im weiteren Versuchverlauf kam es zu einem kontinuierlichen Abfall des Blutdruckes auf etwa 75 mmHg bei Versuchsende. Dieser Verlauf ist am ehesten auf die lange Versuchsdauer mit entsprechenden Flüssigkeitsverlusten zurückzuführen.

4.2. Effekte von Losartan im akuten ischämischen Nierenversagen

Die erste Versuchsgruppe erhielt die Substanz Losartan, einen selektiven AT₁-Antagonisten ohne intrinsische Wirkung, in einer Dosierung von 0,01 mg/Kg KG/h. Festgelegt wurde die Dosierung anhand einer Vorversuchsreihe zur Dosisfindung.

In einer Reihe unterschiedlicher Arbeiten konnte die Beteiligung von AT₁-Rezeptoren bei verschiedenen renalen Funktionen nachgewiesen werden. Als Zielstruktur von Angiotensin-II vermitteln sie die Effekte, die über das RAAS verursacht werden. Lokalisiert sind die AT₁-Rezeptoren v.a. im Bereich der kortikalen Arteriolen, den Vasa afferentia und efferentia, der glomerulären Mesangiumzellen und in den Gefäßen des äußeren Marks ^[61, 70, 71]. Sie vermitteln in erster Linie eine Vasokonstriktion und eine Kontraktion der Mesangiumzellen ^[61, 70, 72]. Die AT₁-Rezeptoren sind außerdem mitbeteiligt an der Regulation exkretorischer Funktionen der Niere ^[70, 73, 74].

Welche Rolle spielt nun eine Blockade der AT₁-Rezeptoren im akuten ischämischen Nierenversagen? Wie bereits erläutert, kommt es im ANV zu einem Überwiegen vasokonstriktorischer Einflüsse, die zum einem aus einer verminderten NO-Wirkung bei gleichzeitig postischämisch gesteigerten Angiotensin-II-Spiegeln resultieren ^[75].

Bei den mit Losartan behandelten Tiere fiel die GFR in der Infusionsphase zunächst um 40 %, im weiteren Verlauf um weitere 60 % ab. Damit lag die Versuchsgruppe unter den Werten der Kontrollgruppe. Dies widerspricht zunächst Beobachtungen, bei denen die GFR unter Losartan anstieg ^[35, 46, 73]. Allerdings konnte gezeigt werden, daß die GFR unter Losartaneinfluß unterschiedliche Reaktionen aufweisen kann ^[61, 72, 76]. Es ist bekannt, daß die Wirkung von Angiotensin in den Vasa efferentia wesentlich stärker ist als in den Vasa afferentia ^[70]. Eine AT₁-Blockade würde sich daher in den efferenten Arteriolen deutlicher bemerkbar machen als in den präglomerulären Gefäßen. Die Folge wäre ein verminderter glomerulärer Filtrationsdruck und damit ein

Abfall der GFR. Diese Annahme wird gestützt durch die Werte der Filtrationsfraktion (FF). Auch hier beobachtet man unter Losartan einen deutlichen Abfall, während die FF in der Kontrollgruppe ansteigt. Der Anstieg kann analog durch eine in den postglomerulären Gefäßen manifeste Vasokonstriktion infolge der postischämisch gesteigerten Angiotensin-Spiegel erklärt werden.

Die Werte des renalen vaskulären Widerstandes stiegen bei den Losartan-Tieren stärker an als in der Kontrollgruppe. Entsprechend fand man in beiden Gruppen einen geringfügig verminderten RPF. Der renale Plasmafluß war unter Losartan etwas deutlicher vermindert als in der Kontrolle, was den Veränderungen des RVR entspricht. Dies widerspricht den Ergebnissen anderer Untersuchungen, bei denen unter AT₁-Blockade eine Abnahme des RVR mit gleichzeitiger Zunahme des RPF auftrat ^[76]. Allerdings wurde bei diesen Versuchen Losartan 20 mal höher dosiert und es lag keine ischämische Schädigung der Nieren vor. So wäre es denkbar, daß bei den hohen Konzentrationen von Angiotensin, die unter ischämischer Schädigung in der Niere nachweisbar sind ^[75], die hier verwendete Dosierung von 0,01 mg/Kg KG nicht ausreicht, um die beschriebenen Effekte zu erzielen. Berücksichtigt man die hohen Fehler des Mittelwertes im Losartan-Kollektiv, ist von heterogenen Werten auszugehen, die eine „Unruhe im System“ dieses Tiermodells widerspiegeln. Ein direkter Vergleich mit der Kontrollgruppe ist deshalb nicht möglich. Deshalb ist die Annahme gerechtfertigt, von einem vergleichbaren Anstieg auszugehen. Ein fehlender Abfall des RVR unter AT₁-Blockade kann auch durch die Tatsache erklärt werden, daß neben Angiotensin-II auch andere vasokonstriktorische Substanzen (z. B. Endothelin) postischämisch erhöht sind ^[68], die den vaskulären Widerstand steigern.

Die fraktionelle Natriumausscheidung steigt in allen Gruppen (siehe Tabelle 10) postischämisch auf etwa das 10fache des Ausgangswertes an. Diese Veränderungen gehen im ischämischen Nierenversagen auf verschiedene Faktoren zurück: Zum einen kommt es zu einer Schädigung der Ionentransporter, wodurch die Natriumrückresorption reduziert wird. Weiterhin weiß man, daß über die Stimulation sowohl von AT₁- als auch von AT₂-Rezeptoren durch Angiotensin-II eine direkte Beeinflussung der Natriumexkretion statt findet. Diese ist abhängig von der vorherrschenden Angiotensin-II-Konzentration: Hohe Konzentrationen steigern die FeNa, geringe Konzentrationen reduzieren sie ^[35, 70, 73, 74]. Da im ischämischen Nierenversagen von hohen Angiotensin-II-Spiegeln ausgegangen werden kann, kommt es durch die Angiotensinwirkung zu einer gesteigerten Na-Exkretion. Zu guter Letzt bewirken die hohen Angiotensinspiegel über die Veränderungen des

Gefäßwiderstandes, der v.a. im Bereich der efferenten Arteriolen auftritt ^[70], eine erhöhten Filtrationsdruck und damit eine gesteigerte Filtrationsfraktion. Ein entsprechender Anstieg kann bei der Kontrollgruppe beobachtet werden. Im Rahmen dieser gesteigerten Filtrationsfraktion wird letztendlich auch verstärkt Natrium ausgeschieden.

Die Versuchsergebnisse zeigen bei allen Gruppen den zu erwartenden Anstieg der FeNa nach der Ischämie an. Im Rahmen der Reperfusion sind die Werte bei den Kontrolltieren rückläufig. Eine Verabreichung von Losartan führt entgegen den Erwartungen zunächst zu einem deutlichen Anstieg der FeNa um 70 % und anschließend zu einem kontinuierlichen Abfall auf Werte, die dann über denen der Kontrollgruppe liegen. Ein Anstieg der FeNa unter Losartan wurde aber bereits in anderen Arbeiten beschrieben ^[35, 46, 73]. Es ist bekannt, daß die exkretorische Wirkung unter Angiotensin-II neben AT₁- auch über AT₂-Rezeptoren gesteuert wird. Deshalb geht man davon aus, daß eine selektive Blockade der AT₁-Rezeptoren den Effekt nicht aufheben kann.

Betrachtet man in diesem Zusammenhang die Filtrationsfraktion, so stellt man fest, daß es zunächst zu einem Abfall und dann zu einem leichten Wiederanstieg kommt. Der Abfall kann aus der Tatsache erklärt werden, daß eine AT₁-Blockade v. a. die efferente Arteriole betrifft ^[70] und über eine Vasodilatation zu einem verminderten Filtrationsdruck führt. Aus diesem Verlauf müßte man eher einen Anstieg als einen Abfall der FeNa erwarten. Dieser scheinbare Widerspruch legt nahe, daß die Natrium-Exkretion v. a. über die direkten Effekte von Ang-II am Tubulus selbst beeinflusst wird und so die FF in diesem Zusammenspiel eher eine untergeordnete Rolle spielt ^[73, 77].

Im Gegensatz zu den Unterschieden der Natriumausscheidung zwischen der Losartan- und Kontrollgruppe unterscheiden sich die Urinzeitvolumina bei beiden Gruppen nicht.

Der systemische Blutdruck lag bei den Tieren, die Losartan erhielten, während und nach der Infusionsphase am niedrigsten. Dies entspricht der Tatsache, daß Losartan als selektiver AT₁-Antagonist die blutdrucksteigernde Wirkung von Angiotensin-II verhindert.

4.3. Effekte von Losartan und L-Arginin im akuten ischämischen Nierenversagen

L-Arginin ist die Ausgangssubstanz, aus der durch die NO-Synthase NO abgespalten wird. Da man davon ausgeht, daß im akuten Nierenversagen ein relativer Mangel von NO vorherrscht, wurde in verschiedenen Arbeiten der Einfluß von NO in Nierenversagen untersucht. Dabei zeigte sich eine Verbesserung der Nierenfunktion unter Zufuhr von L-Arginin [22, 31, 68]. In der zweiten Versuchsgruppe wurde Losartan mit L-Arginin kombiniert, um zu sehen, ob und in wie weit synergistische Effekte auf die Nierenfunktion nachweisbar sind.

Betrachtet man zunächst die GFR als Hauptmarker der Nierenfunktion, so stellt man fest, daß die GFR im Vergleich zur Kontrollgruppe und der Losartangruppe höher ist. Gegenüber alleiniger Losartangabe besteht sogar ein signifikanter Unterschied ($p=0,025$). Dies entspricht den Beobachtungen anderer Untersucher [22, 31]. Zurückzuführen ist dieser Effekt wahrscheinlich auf eine Vasodilatation durch die vermehrte NO-Bildung bei gleichzeitiger Blockade vasokonstriktorischer Einflüsse. Zum anderen beeinflusst NO über den Tonus der Mesangialzellen auch den Ultrafiltrationskoeffizienten K_f [24], wodurch ebenso die GFR verbessert wird. Entsprechend dieser Annahmen zeigt sich auch bei der Kombination von Losartan mit L-Arg im Vergleich zu den anderen Gruppen der geringste RVR. Der RPF liegt oberhalb der Werte der Kontroll- und Losartan-Gruppe und zeigt im Vergleich zum RPF nach dem Clampen tendenziell eine leichte Zunahme. Diese ist zwar nur sehr schwach ausgeprägt, aber es wird in jedem Fall ein konstantes Niveau gehalten, während bei den Kontroll- und Losartan-Tieren ein tendenzieller Abfall zu verzeichnen ist.

Die Filtrationsfraktion fällt unter der Kombination Losartan und L-Arginin mit Beginn der Infusionsphase kontinuierlich ab und erreicht die niedrigsten Werte aller Gruppen. Eigentlich müßte man bei höheren GFR-Werten und geringem RVR eher einen Anstieg der FF erwarten, aber durch die vasodilatierende Wirkung von Losartan in den Vasa efferentia wird der Filtrationsdruck reduziert.

Unter zusätzlicher Verabreichung von L-Arginin kommt es zu einer Aufhebung der Losartanwirkung allein auf die Natrium-Exkretion. Zwar beobachtet man auch einen Anstieg nach Beginn der Infusionsperiode, der allerdings nicht sehr ausgeprägt ist. Analog zur Losartangruppe kommt es dann im weiteren Verlauf zu einem Abfall. Im Vergleich zur Kontrollgruppe ist die FeNa unter Losartan und L-Arginin höher. Diese Beobachtung legt nahe, daß durch L-Arginin die Losartanwirkung in bezug auf die

FeNa vermindert wird. Diese Annahme wird bestärkt durch Untersuchungen, die gezeigt haben, daß L-Arginin postischämisch die FeNa reduziert ^[26, 68].

Entsprechend der vermehrten Salzausscheidung nimmt auch das Urinzeitvolumen zu. Unter Gabe von L-Arginin werden höhere Werte als bei den Kontrolltieren und den Tieren, die nur Losartan erhalten haben, gemessen.

4.4. Effekte von Losartan und L-NMMA im akuten ischämischen Nierenversagen

Zahlreiche Arbeiten belegen, daß eine Hemmung der NOS durch L-NMMA zu einem Überwiegen vasokonstriktorischer Einflüsse auf die Nierenfunktion führt. Da eine dieser gefäßverengenden Substanzen Angiotensin-II ist, darf vermutet werden, daß ein Teil dieser Effekte von L-NMMA in der Niere wahrscheinlich durch Ang-II vermittelt wird ^[35, 42]. Mit dieser Überlegung stellt sich die Frage, welche Auswirkungen eine kombinierte Hemmung der NOS und der AT₁-Rezeptoren hat.

Paradoxerweise steigt die GFR unter dieser Kombination bis auf das 2,5-fache des Wertes nach Clamping an. Hier besteht gegenüber der Kontrollgruppe sogar ein signifikanter Unterschied (p=0,010). Der RPF steigt ebenfalls tendenziell an und erreicht die höchsten Werte aller Gruppen, wobei der Anstieg hier nur auf das 1,5-fache erfolgt. Auch hier besteht ein signifikanter Unterschied zur Kontrollgruppe (p=0,026 und p=0,010). Der renal-vaskuläre Widerstand steigt unter Losartan und L-NMMA zunächst deutlich an, fällt dann aber im Laufe der Infusionsphase auf Werte ab, die denen von Losartan und L-Arginin entsprechen. Wie kann dieser Widerspruch zu den bekannten Untersuchungen, wonach GFR, RPF und RVR durch L-NMMA negativ beeinflusst werden, erklärt werden?

Wie bereits erwähnt, wird der vasokonstriktorische Effekt der NOS-Blockade über eine Angiotensin-II-Wirkung vermittelt ^[35, 42]. Blockt man die Zielrezeptoren von Ang-II gleichzeitig mit Losartan, so muß man wohl, angesichts der Ergebnisse dieser Arbeit, annehmen, daß damit der Effekt von L-NMMA aufgehoben werden kann. Ähnliche Abschwächungen der L-NMMA-Effekte wurden bereits von anderen Autoren beschrieben ^[24, 35, 42, 46, 78].

Warum aber kommt es in diesem Versuchsmodell nicht nur zu einer Abschwächung, sondern sogar zu einer Verbesserung der Parameter im Vergleich zur Kontrollgruppe, während die alleinige Gabe von Losartan zu keinen wesentlichen Unterschied führte?

Als einzige sinnvolle Erklärung kommt wohl eine Umverteilung der renalen Durchblutung in Frage. Die Regulation der kortikalen Perfusion hängt vom Gleichgewicht zwischen NO und Angiotensin-II ab ^[45] und zeigt somit die Merkmale einer effizienten Autoregulation. AT₁-Rezeptoren sind vor allem in den kortikalen Bereichen nachgewiesen worden, weniger jedoch im Nierenmarkbereich ^[61, 70, 79]. Andererseits ist im Nierenmark eine hohe Dichte der iNOS, der besonders aktiven Form der NO-Synthetasen, gefunden worden ^[20, 22, 23], so daß sich hier der wichtigste Produktionsort von NO vermuten läßt ^[22, 23].

Die Wirkung auf die Hämodynamik der Nierenrinde wird vor allem über AT₁-Rezeptoren vermittelt ^[70, 73, 74], während die Durchblutung des Markes in erster Linie vom Perfusionsdruck abhängt ^[45]. Die Gabe von Losartan führt zu einer Zunahme der kortikalen Durchblutung ^[45, 76]; da hier auch die Glomerula lokalisiert sind, muß im Zuge der ansteigenden Perfusion auch die GFR zunehmen. Die Hemmung der NOS-Aktivität im Mark durch L-NMMA führt dagegen zu einer Erhöhung des regionalen Gefäßwiderstandes, wodurch die kortikale Perfusion zunimmt.

Es ist bekannt, daß beim akuten ischämischen Nierenversagen eine Verminderung der kortikalen Durchblutung zu Lasten der medullären Perfusion eintritt ^[4]. Wahrscheinlich war die hier verwendete Losartandosis zu gering, um die Hämodynamik der Nierenrinde zu beeinflussen. Auch die kombinierte Gabe von Losartan und L-Arginin ergab keine Verbesserung der kortikalen Perfusion. Wahrscheinlich hat L-Arginin die Markdurchblutung gesteigert und somit der Zunahme der Rindendurchblutung entgegengewirkt. Dagegen hatte die kombinierte Applikation von Losartan und L-NMMA den Effekt der Erhöhung der GFR und des RPF; erst durch diese Kombination kam es zur Umverteilung der Perfusion in den kortikalen Bereich mit deutlicher Zunahme der Nierenfunktionsparameter wie GFR und RPF.

Der Verlauf des RVR entspricht zunächst dem der Losartan-Gruppe. Im weiteren geht der vaskuläre Widerstand jedoch auf Werte, die geringer sind als in der Kontrollgruppe, zurück. Eigentlich würde man unter L-NMMA eher einen Anstieg erwarten. Es konnte jedoch gezeigt werden, daß eine NOS-Hemmung unter einer ischämischen Schädigung zu keinem RVR-Anstieg führt ^[22, 80].

Die Filtrationsfraktion zeigt über die Infusionsphase hinaus einen kontinuierlichen Anstieg. Dies entspricht den Beobachtungen aus der Literatur ^[46, 81]. Zurückgeführt wird dieser Effekt auf die Tatsache, daß bei alleiniger Gabe von L-NMMA die GFR wesentlich schwächer abfällt als der RPF; aus der Beziehung zwischen GFR und RPF

ergibt sich dann zwangsläufig ein Anstieg der FF ^[81]. Durch Blockade der NO-Synthese kommt die Ang-II-Wirkung im efferenten Bereich voll zum Tragen und bewirkt so eine Zunahme des effektiven Filtrationsdruckes. Warum diese Erhöhung bei einer Kombination mit Losartan erhalten bleibt, kann nur auf die vermehrte kortikale Perfusion zurückgeführt werden.

Betrachtet man die fraktionelle Natrium-Exkretion, stellt man fest, daß diese unter Losartan und L-NMMA in etwa dem Verlauf der Kontrollgruppe entspricht. Die Literatur beschreibt unter alleiniger Gabe von L-NMMA eine Zunahme der FeNa, die auf einen direkten Einfluß von L-NMMA im Tubulusbereich zurückgeführt wird ^[35, 82]. Weiterhin konnte gezeigt werden, daß dieser Effekt durch die gleichzeitige Applikation von Losartan vermindert werden kann ^[35, 45, 46]. Dies würde den Ergebnissen dieser Arbeit entsprechen.

Das Urinzeitvolumen ist im Vergleich zu den anderen Gruppen am höchsten und zeigt den geringsten Abfall. Diese Beobachtung kann durch die deutliche verbesserte GFR ausreichend erklärt werden und entspricht auch Ergebnissen anderer Untersuchungen, die zeigen, daß es unter L-NMMA zu einer Zunahme des Urinflusses kommt ^[81].

Im Hinblick auf den Blutdruck zeigen sich im Vergleich zu den anderen Gruppen keine wesentlichen Unterschiede. Der kontinuierliche Abfall während des Versuches kann bei allen Tieren auf die Versuchsdauer zurückgeführt werden.

5. Zusammenfassung und Schlußfolgerungen

Die bekannten Veränderung im akuten ischämischen Nierenversagen konnten mit den Versuchen bestätigt werden: Es kam zu einem Abfall der GFR und des RPF bei gleichzeitigem Anstieg des RVR. Zurückzuführen sind diese Veränderungen auf eine Störung des Gleichgewichts zwischen vasodilatierenden und vasokonstringierenden Einflüssen als Folge der Ischämie. Auch eine Störung der exkretorischen Funktionen der Niere konnte gezeigt werden. Der Anstieg der Filtrationsfraktion in der Kontrollgruppe weist auf einen gesteigerten Gefäßwiderstand in den efferenten Arteriolen hin. Der im Verlauf des Versuches kontinuierlich abfallende systemische Blutdruck, der sich bei allen Gruppen gleichermaßen zeigte, ist am ehesten auf die Versuchsdauer und den Flüssigkeitsverlust in dieser Zeit zurückzuführen.

Die alleinige Gabe von Losartan führte zu einem Abfall der GFR. Diese Reaktion wurde bereits in der Literatur beschrieben und wird dadurch erklärt, daß sich die selektive AT₁-Blockade v.a. im postglomerulären Bereich auswirkt und somit zu einer Abnahme des effektiven Filtrationsdruckes führt. Diese Annahme wird durch entsprechende Veränderungen der Filtrationsfraktion gestützt. Da in diesem Versuchsdesign die Dosierung von Losartan zu gering war, blieb der erwartete Anstieg des RPF und der Abfall des RVR aus.

Die zusätzliche Gabe von L-Arginin führte im Vergleich zur alleinigen Losartan-Applikation jedoch zu einer signifikanten Verbesserung der GFR. Auch der RPF und der RVR werden dadurch positiv beeinflusst. Diese Effekte sind Folge einer vermehrten NO-Bildung, wodurch es zu Vasodilatation und Relaxation der Mesangiumzellen kommt.

Die Blockade der NOS mit L-NMMA führte zu einem signifikanten Zuwachs von GFR und RPF. Ursache sind Umverteilungsvorgängen der renalen Perfusion: Die Nierenrinde wird besser durchblutet und RPF sowie GFR steigen an.

Unter Losartan kam es trotz erniedrigter Filtrationsfraktion zu einem Anstieg der fraktionellen Natrium-Excretion. Wie von anderen Untersuchern beschrieben, werden die exkretorischen Funktionen des durch Angiotensin-II beeinflusst. Da diese Wirkung sowohl über AT₁- als auch AT₂-Rezeptoren vermittelt, führt die alleinige AT₁-Blockade nicht zu dem erwarteten Abfall der FeNa.

Durch gleichzeitige Gabe von L-Arginin wird der Anstieg der FeNa gedämpft. Da die zusätzlicher Gabe von L-Arginin eine Vasodilatation am Vas efferens bewirkt, nimmt

die Filtrationsfraktion ab. Es kommt dadurch zu einer insgesamt verminderten Filtration und verminderten Natriumausscheidung. Auch L-NMMA dämpft den Anstieg, wenn auch wesentlich stärker, so daß hier Werte erreicht werden, die denen der Kontrollgruppe entsprechen.

Zusammenfassend kann gesagt werden, daß die selektive AT₁-Blockade durch Losartan im akuten ischämischen Nierenversagen einen positiven Einfluß auf den die Nierenfunktion zeigt. Diese Aussage konnte in anderen Untersuchungen bestätigt werden ^[75, 83]. Die Ursache hierfür liegt v.a. in der Blockade der Angiotensin-II-Wirkung, die eine der wichtigsten Rollen in der Pathophysiologie des akuten Nierenversagens überhaupt spielt.

Die Kombination mit L-Arginin führte zu einer weiteren Verbesserung der Nierenfunktion. Überraschenderweise führte die Kombination von Losartan mit L-NMMA statt zu einer weiteren Verschlechterung eher zu einer Verbesserung. Dies bedeutet, daß durch die simultane AT₁-Blockade die schädlichen Effekte von L-NMMA gemindert werden können, und in der Kombination mit L-NMMA, wohl aufgrund von Umverteilungsvorgängen der renalen Mikrozirkulation, sogar ein Vorteil für die Nierenfunktion gewonnen werden kann.

6. Anhang Statistik

Folgende Tabelle gibt die Wahrscheinlichkeitswerte des t-Test nach Student für normal verteilte Werte, des U-Test nach Mann und Withney (für nicht normal verteilte Werte) und die Signifikanzen im ANOVA Test wieder:

Parameter	Zeitpunkt in min	Kontrolle vs. Losartan	Kontrolle vs. Losartan + L-Arg	Kontrolle vs. Losartan + L-NMMA	Losartan vs. Losartan + L-Arg	Losartan vs. Losartan + L-NMMA	Losartan + L-Arg vs. Losartan + L-NMMA
Urin	50	0,948	0,666	0,783	0,657	0,789	0,977
	120	0,592	0,706	0,755	0,784	0,746	0,945
	205	0,812	0,252	0,154	0,541	0,448	0,921
	260	0,482	0,078	0,012 *	0,065	0,016 *	0,386
	320	0,601	0,208	0,012 *	0,158	0,021 *	0,135
GFR	50	0,677	0,433	0,565	0,657	0,875	0,664
	120	0,675	0,349	0,083	0,602	0,889	0,541
	205	0,831	0,529	0,059	0,430	0,177	0,294
	260	0,182	0,186	0,026 *	0,025 *	0,044 *	0,062
	320	0,968	0,125	0,010 *	0,201	0,039 *	0,059
RPF	50	0,394	0,058	0,100	0,255	0,468	0,395
	120	0,814	0,418	0,916	0,580	0,613	0,488
	205	0,977	0,227	0,016 *	0,220	0,156	0,529
	260	0,338	0,142	0,036 *	0,063	0,060	0,462
	320	0,559	0,036 *	0,059	0,047 *	0,124	0,723
RVR	50	0,277	0,246	0,319	0,851	0,891	1,000
	120	0,824	0,927	0,893	0,945	0,924	0,998
	205	0,935	0,224	0,064	0,164	0,188	0,958
	260	0,397	0,247	0,064	0,066	0,271	0,344
	320	0,570	0,638	0,093	0,143	0,040 *	0,636
FF	50	0,481	0,271	0,237	0,649	0,651	0,841
	120	0,668	0,755	0,484	0,869	0,287	0,305
	205	0,362	0,307	0,214	0,888	0,929	0,923
	260	0,460	0,113	0,342	0,507	0,825	0,461
	320	0,507	0,224	0,711	0,306	0,884	0,371
FeNa	50	0,298	0,822	0,796	0,575	0,500	0,996
	120	0,844	0,867	0,981	0,790	0,852	0,944
	205	0,753	0,789	0,134	0,631	0,115	0,336
	260	0,177	0,825	0,455	0,053	0,049 *	0,425
	320	0,404	0,261	0,219	0,086	0,089	0,724
MAP	50	0,272	0,905	0,602	0,417	0,713	0,705
	120	0,426	0,727	0,162	0,834	0,538	0,448
	205	0,178	0,589	0,610	0,497	0,433	0,952
	260	0,136	0,944	0,937	0,214	0,157	1,000
	320	0,218	0,773	0,911	0,246	0,131	0,656

Tab. 12: Übersicht über die p-Werte der statistischen Auswertung

* Signifikanz nach t- bzw. U-Test

grau unterlegt: Signifikanz nach ANOVA

7. Literaturverzeichnis

1. Heidbreder, E., Schafferhans K., Geiger H., and Bahner U.: **Akutes Nierenversagen**; medwelt 1989; 40: 612-615
2. Schollmeyer, P., Wanner, C., Kaufmann, W., and Löhr, G.: **Akutes Nierenversagen**; Pathophysiologie, 4. Auflage, 1991; 519-520
3. Mohaupt, M. and Kramer, H. J.: **Acute ischemic renal failure: review of experimental studies on pathophysiology and potential protective interventions.**; Ren.Fail. 1989; 11: 177-185
4. Bonventre, J. V.: **Mechanisms of ischemic acute renal failure [clinical conference]**; Kidney Int. 1993; 43: 1160-1178
5. Brezis M., Rosen S., Silva P., and Epstein FH: **Renal ischemia: A new perspective**; Kidney Int. 1984; 26: 375-383
6. Epstein FH, Silva P., Spokes K., and Brezis M.: **Renal medullary Na-K-ATPase and hypoxic injury in perfused rat kidneys**; Kidney Int. 1989; 36: 768-772
7. Hierholzer, K., Fromm, M., Schmidt, R. F., and Thews, G.: **Funktion der Niere**; Physiologie des Menschen, 26. Auflage, 1995; 737-776
8. Mason J., Beck F., Dorge A., Rick R., and Thurau K.: **Intracellular electrolyte composition of renal tubules following renal ischemia**; Kidney Int. 1981; 20: 61-70
9. Tscherner, M. and Heidland, A.: **Akutes Nierenversagen**; Innere Medizin 1994; 3: 1332-1339
10. Young EW. and Humes HD: **Calcium and acute renal failure**; Miner Electrol Metab 1991; 17: 106-111

11. Yin HL. and Stossel TP.: **Control of cytoplasmic actin gel-sol transformation by gelsolin, a calcium dependent regulatory protein**; Nature 1979; 281: 583-586
12. Marsden, P. A.: **Novel autocrine/paracrine regulators of the circulation**; Semin Nephrol 1991; 11: 169-185
13. Furchgott, R. F. and Zawadzki, J. V.: **The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine**; Nature 1980; 288: 373-376
14. Stuehr, D. J., Cho, H. J., Kwon, N. S., and Nathan, C. F.: **Purification and characterization of the cytokine-induced macrophage nitric oxide synthase: an FAD-and FMN-containing flavoprotein**; Proc.Natl.Acad.Sci.USA 1991; 88: 773-777
15. Beckman, J. S.: **The double edged role of nitric oxide in brain function and superoxide-mediated injury**; J.Develop.Physiol. 1991; 15: 53-59
16. Curran, R. D., Billiar, T. R., Stuehr, D. J., Ochoa, J. B., and Harbrecht, B. G.: **Multiple cytokines are required to induce hepatocyte nitric oxide production and inhibit total protein biosynthesis**; Ann.Surg. 1990; 212: 462-471
17. Miwa, M, Tsuda, Y., Kurashima, Y., Hara, H., Tanaka, Y., and Shinohara, K.: **Macrophage-mediated N-nitrosation of thioproline and proline**; Biochem.Biophys.Res.Commun. 1989; 159: 373-378
18. Lancaster, J. R. and Hibbs, J. R.: **EPR demonstration of ironnitrosyl complex formation by cytotoxic activated macrophages**; Proc.Natl.Acad.Sci.USA 1990; 87: 1223-1227

19. Bachmann, S., Bosse, H., and Mundel, P.: **Topography of nitric oxide synthesis by localizing constitutive NO synthases in mammalian kidney**; Am J Physiol. 1995; 268: F885-F898
20. Tojo, A., Gross, SS, Zhang, LC, Tischer, CC, Schmidt, HHHW, Wilcox, C. S., and Madsen, K. M.: **Immunocytochemical localization of distinct isoforms of nitric oxide synthase in the juxtaglomerular apparatus of normal rat kidney**; J.Am.Soc.Nephrol. 1994; 4: 1438-1447
21. Morrissey, J. J., McCracken, R., Kaneto, H, Vehaskari, M., Montani, D., and Klahr, S.: **Location of an inducible nitric oxide synthase mRNA in the normal kidney**; FASEB J 1992; 6: 3051-3064
22. Peer, G., Blum, M., and Iaina, A.: **Nitric oxide and acute renal failure [editorial] [see comments]**; Nephron 1996; 73: 375-381
23. Ruilope, L. M., Lahera, V., Rodicio, J. L., and Romero, J. C.: **Participation of nitric oxide in the regulation of renal function: Possible role in the genesis of hypertension**; J.Hypertens. 1994; 1994: 625-631
24. Tojo, A., Madsen, K. M., and Wilcox, C. S.: **Expression of immunoreactive nitric oxide synthase isoforms in rat kidney. Effects of dietary salt and losartan.**; Jpn.Heart J 1995; 36: 389-398
25. Gardiner, S. M., Compton, A. M., Bennet, T., Palmer, R. M. J., and Moncada, S.: **Control of regional blood flow by endothelium-derived nitric oxide**; Hypertension 1990; 15: 486-492
26. Kiyomoto, H., Matsuo, H., Tamaki, T., Aki, Y. , Hong, H., Iwao, H., and Abe, Y.: **Effect of L-NG-nitro-arginine, an inhibitor of nitric oxide synthesis, on autoregulation of renal blood flow in dogs**; Japan J Pharmacol 1992; 58: 147-155

27. Tolins, J. P. and Raij, L.: **Effects of amino acid infusion on renal hemodynamics. Role of endothelium-derived relaxing factor;** Hypertension 1991; 17: 1045-1051
28. Bhardwaj, R. P. and Moore, K.: **The effect of arginine and nitric oxide on resistance blood vessels of the perfused rat kidney;** Br J Pharmacol 1989; 97: 739-744
29. Ito, S., Johnson, C. S., and Carretero, O. A.: **Modulation of angiotensin II-induced vasoconstriction by endothelium-derived relaxing factor in the isolated microperfused rabbit afferent arteriole.;** J Clin Invest 1991; 87: 1656-1663
30. Shultz, P. J., Schorer A.E., and Raij, L.: **Effects of endothelium-derived relaxing factor and nitric oxide on rat mesangial cells;** Am J Physiol. 1989: F162-F167
31. Schramm, L., Heidbreder, E., Zimmermann, J., Lopau, K., and Wanner, C.: **Acute renal failure: Influence of nitric oxide on renal function;** Journal of nephrology 1996; 9: 118-125
32. DeNicola, L., Blantz, R. C., and Gabbai, F. B.: **Nitric oxide and angiotensin II. Glomerular and tubular interaction in the rat;** J Clin Invest 1992; 89: 1248-1256
33. Schaefer, K. L. and Porter, J. A.: **Angiotensin II receptor antagonists: the prototype losartan.;** Ann.Pharmacother. 1996; 30: 625-636
34. Kin S., Sasaki T., Nakayama K., Tamura K., Nakai I., and Oka T.: **The cytoprotective role of nitric oxide in ischemia-reperfusion injury in the rat kidney;** Transplant.Proc. 1995; 27: 754-756
35. De, Nicola L., Blantz, R. C., and Gabbai, F. B.: **Nitric oxide and angiotensin II. Glomerular and tubular interaction in the rat.;** J Clin Invest 1992; 89: 1248-1256

36. Ito, S., Juncos, L. A., Nushiro, N., Johnson, C. S., and Carretero, O. A.: **Endothelium-derived relaxing factor modulates endothelin action in afferent arterioles.**; Hypertension 1991; 17: 1052-1056
37. Conger J.D., Robinette J.B., and Schrier R.W.: **Smooth muscle and endothelium-derived relaxing factor in the abnormal vascular response of acute renal failure**; J Clin Invest 1988; 82: 532-537
38. Cristol, J. P., Thiernemann, C., Mitchell, J. A., Walder, C., and Vane, J. R.: **Support of renal blood flow after ischaemic-reperfusion injury by endogenous formation of nitric oxide and of cyclo-oxygenase vasodilator metabolites.**; Br J Pharmacol 1993; 109: 188-194
39. Stadler, J., Billiar, T. R., Curran, R. D., Stuehr, D. J., Ochoa, J. B., and Simmons, R. L.: **Effect of exogenous and endogenous nitric oxide on mitochondrial respiration of rat hepatocytes.**; Am J Physiol. 1991; 260: C910-C916
40. Provost P., Lam, J. Y. T., Lacoste L., Merhi, Y., and Walters D.: **Endothelium-derived nitric oxide attenuates neutrophil adhesion to endothelium under arterial flow conditions**; Arterioscler Thromb 1994; 14: 331-335
41. Thorup, C., Kornfeld, M., Winaver, J. M., Goligorsky, M. S., and Moore, L. C.: **Angiotensin-II stimulates nitric oxide release in isolated perfused renal resistance arteries.**; Pflugers Arch. 1998; 435: 432-434
42. Sigmon, D. H., Carretero, O. A., and Beierwaltes, W. H.: **Angiotensin dependence of endothelium-mediated renal hemodynamics.**; Hypertension 1992; 20: 643-650
43. Boulanger, C. M., Caputo, L., and Levy, B. I.: **Endothelial AT1-mediated release of nitric oxide decreases angiotensin II contractions in rat carotic artery**; Hypertension 1995; 26: 752-757

44. Siragy, H. M. and Carey, R. M.: **The subtype 2 (AT₂) angiotensin receptor mediates renal production of nitric oxide in conscious rats.;** J.Clin.Invest. 1997; 100: 264-269
45. Madrid, M. I., Garcia, Salom M., Tornel, J., de, Gasparo M., and Fenoy, F. J.: **Interactions between nitric oxide and angiotensin II on renal cortical and papillary blood flow.;** Hypertension 1997; 30: 1175-1182
46. Gabbai, F. B., Garcia, G. E., Blantz, R. C., and De, Nicola L.: **Role of nitric oxide in glomerular physiology and pathophysiology.;** Adv.Nephrol.Necker.Hosp. 1995; 24: 3-18
47. Vidal, M. J., Romero, J. C., and Vanhoutte, P. M.: **Endothelium-derived relaxing factor inhibits renin release.;** Eur.J.Pharmacol. 1988; 149: 401-402
48. Lo, M-W., Goldberg, M. R., McCrea, J. B., and et al.: **Pharmacokinetics of losartan, an angiotensin II receptor antagonist, and its active metabolite EXP3174 in humans;** Clin Pharmacol Ther 1995; 58: 641-649
49. Merck & Co., Inc.: **Losartan potassium prescribing information;** West Point, PA 19486, USA 1995
50. Stearns, R. A., Chakravarty, P. K., Chen, R., and et al.: **Biotransformation of losartan to its active carboxylic acid metabolite in human liver microsomes: role of cytochrome P4502C and 3A subfamily members;** Drug Metab Dispos 1995; 23: 207-215
51. Wong, P. C., Price, W. A., Chiu, A. T., and et al.: **Nonpeptide angiotensin II receptor antagonists. XI. Pharmacology of EXP3174: an active metabolite of DuP 753, an orally active antihypertensive agent;** J Pharmacol Exp Ther 1990; 255: 211-217

52. Ohtawa, M., Takayama, F., and Saitoh, K.: **Pharmacokinetics and biochemical efficacy after single and multiple oral administration of losartan, an orally active nonpeptide angiotensin II receptor antagonist, in humans;** Br J Pharmacol 1993; 35: 290-297
53. Sica, D. A, Lo, M-W., Shaw, W., and et al.: **The pharmacokinetics of losartan in renal insufficiency;** J Hypertens 1995; 13 Suppl.: S49-S52
54. Chiu, A. T., Herblin, W. F., McCall, D. E., Ardecky, R. J., Carini, D. J., Duncia, J. V., Pease, L. J., Wong, P. C., Wexler, R. R., Johnson, A. L., and et, al: **Identification of angiotensin II receptor subtypes.;** Biochem Biophys Res Commun 1989; 165: 196-203
55. Tsutsumi, K., Viswanathan, M., Stromberg, C., and Saavedra, J. M.: **Type-1 and type-2 angiotensin II receptors in fetal rat brain.;** Eur.J Pharmacol 1991; 198: 89-92
56. Whitebread, S., Mele, M., Kamber, B., and de, Gasparo M.: **Preliminary biochemical characterization of two angiotensin II receptor subtypes.;** Biochem Biophys Res Commun 1989; 163: 284-291
57. Chiu, A. T., McCall, D. E., Ardecky, R. J., and et al.: **Angiotensin II receptor subtypes and their selective nonpeptide ligands;** Receptor 1990; 1: 33-40
58. Chiu, A. T., McCall, D. E., Price, W. A., and et al.: **Nonpetide Angiotensin II receptor antagonists. VII. Cellular and biochemical pharmacology of DuP 735, an orally active antihypertensive agent;** J Pharmacol Exp Ther 1990; 252: 711-8
59. Chiu, A. T., McCall, D. E., and Aldrich, P. E.: **[3H]DuP 753, a highly potent and specific radioligand for the angiotensin II-1 receptor subtype;** Biochem Biophys Res Commun 1990; 172: 1195-202

60. Timmermans, P. B., Wong, P. C., Chiu, A. T., and et al.: **Angiotensin II receptors and angiotensin II receptor antagonists**; Pharmacol Rev 1993; 45: 205-251
61. Franco, M., Paniagua, R., and Herrera, Acosta J.: **Renal effects of renin-angiotensin system blockade.**; Curr.Opin.Nephrol.Hypertens. 1998; 7: 153-158
62. Christen, Y., Waeber, B., and Nussberger, J.: **Dose-response relationships following oral administration of DuP 753 to normal humans**; Am.J.Hypertens. 1991; 4 Suppl.: 350S-3S
63. Goldberg, M. R., Tanaka, W., Barchowsky, A., and et al.: **Effects of losartan on blood pressure, plasma renin activity and angiotensin II in volunteers**; Hypertension 1993; 21: 704-713
64. Burnier, M., Rutschmann, B., Nussberger, J., and et al.: **Salt-dependent renal effects of an angiotensin II antagonist in healthy subjects**; Hypertension 1993; 22: 339-47
65. Shaw, W., Keane, W., Sica, D., and et al.: **Safety and antihypertensive effects of losartan (MK-954; DuP 753) a new angiotensin II receptor antagonist, in patients with hypertension an renal disease [abstract]**; Clin Pharmacol Ther 1993; 53: 140-
66. Shaw, W. and Snively, D.: **Safety and efficacy of losartan (DuP 753, MK 954) in hypertensive patients with renal impairment [abstract]**; J Am Soc Nephrol 1994; 5: 567-
67. Himmelmann, A., Svensson, A., Dahlöf, B., and et al.: **Atenolol versus losartan in hypertension - focus on the left ventricular morphology [abstract]**; J Hypertens 1994; 12 Suppl.: S98-

68. Schramm, L., Heidbreder, E., Schmitt, A., Kartenbender, K., Zimmermann, J., Ling, H., and Heidland, A.: **Role of L-arginine-derived NO in ischemic acute renal failure in the rat.**; Ren.Fail. 1994; 16: 555-569
69. Conger, J., Robinette, J., Villar, A., Raij, L., and 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: 631-638
70. Kimura, K., Inokuchi, S., Sugaya, T., Suzuki, N., Yoneda, H., Shirato, I., Mise, N., Oba, S., Miyashita, K., Tojo, A., Hirata, Y., Goto, A., Sakai, T., Murakami, K., and Omata, M.: **Location and action of angiotensin II type 1 receptor in the renal microcirculation.**; Kidney Int.Suppl. 1997; 63: S201-S204
71. Ruilope, L. M. Angiotensin II-Rezeptoren und Niere. Pamphlet . 1998.
Ref Type: Journal (Full)
72. Navar, L. G., Inscho, E. W., Majid, D. S. A., Imig, J. D., Harrison-Bernard, and Mitchell, K. D.: **Paracrine regulation of the renal micro circulation;** Physiological Rev 1996; 76: 425-536
73. Munoz, Garcia R., Maeso, R., Rodrigo, E., Navarro, J., Ruilope, L. M., Casal, M. C., Cachofeiro, V., and Lahera, V.: **Acute renal excretory actions of losartan in spontaneously hypertensive rats: role of AT2 receptors, prostaglandins, kinins and nitric oxide.**; J.Hypertens. 1995; 13: 1779-1784
74. Keiser, J. A., Bjork, F. A., Hodges, J. C., and Talyos, D. G.: **Renal hemodynamics and excretory responder to PD 123319 and losartan, nonpeptide AT1 and AT2 subtype-specific angiotensin II ligands;** J Pharmacol Exp Ther 1992; 262: 1154-1158
75. Kontogiannis, J. and Burns, K. D.: **Role of AT1 angiotensin II receptors in renal ischemic injury.**; Am.J.Physiol. 1998; 274: F79-F90

76. Fenoy, F. J., Scicli, G., Carretero, O., and Roman, R. J.: **Effect of an angiotensin II and a kinin receptor antagonist on the renal hemodynamic response to captopril.**; Hypertension 1991; 17: 1038-1044
77. Ito, S., Arima, S., Ren, Y. L., Juncos, L. A. , and Carretero, O.: **Endothelium-derived relaxing factor/nitric oxide modulates angiotensin II action in the isolated microperfused rabbit afferent but not efferent arteriole;** J Clin Invest 1994; 91: 2012-2019
78. Sigmon, D. H. and Beierwaltes, W. H.: **Angiotensin II: nitric oxide interaction and the distribution of blood flow;** Am J Physiol. 1993; 265: R1276-
79. Muhl, H., Kunz, D., Rob, P., and Pfeilschifter, J.: **Cyclosporin derivatives inhibit interleukin 1 beta induction of nitric oxide synthase in renal mesangial cells.;** Eur.J.Pharmacol. 1993; 249: 95-100
80. Lieberthal, W., Wolf, E. F., Rennke, H. G., Valeri, C. R., and Levinsky, N. G.: **Renal ischemia and reperfusion impair endothelium-dependent vascular relaxation.;** Am J Physiol. 1989; 256: F894-F900
81. Baylis, C., Harton, P., and Engels, K.: **Endothelial-derived relaxing factor control renal hemodynamics in the normal rat kidney;** J Am Soc Nephrol 1990; 1: 875-881
82. Romero, J. C., Bentley, M. D., Vanhoutte, P. M., and Knox, F. G.: **Intrarenal mechanisms that regulate sodium excretion in relationship to changes in blood pressure.;** Mayo Clin.Proc. 1989; 64: 1406-1424
83. Heller, J., Kramer, H. J., Cervenka, L., and Hellerova, S.: **Losartan protects the rat kidney from ischemic injury.;** Kidney Int.Suppl. 1996; 55: S113-S114

8. Danksagungen

Mein aufrichtiger Dank gilt Herrn Professor Dr. med. E. Heidbreder für die Überlassung des interessanten Themas und für seine Unterstützung bei allen Fragen und Problemen.

Herrn Dr. med. K. Lopau möchte ich für seine stete Ansprechbarkeit und die überdurchschnittlich gute Betreuung danken.

Für die Bereitstellung der Testsubstanz Losartan möchte ich der Firma MSD Sharp & Dohne, Haar, Deutschland, herzlich danken.

Herrn Professor Dr. med. C. Wanner danke ich für die Möglichkeit im Nephrologischen Labor mit der tatkräftigen Unterstützung der Mitarbeiter zu arbeiten. Mein besonderer Dank gilt Frau Sylvia Renker für ihre Hilfe in labortechnischen Fragen und für die unermüdlich Bestimmung von Elektrolytkonzentrationen in kürzester Zeit.

Herrn Professor Dr. med. S. Silbernagl danke ich für die Möglichkeit die spektralfluorometrischen Messungen im Physiologischen Institut der Universität Würzburg durchführen zu können. Besonders möchte ich Frau Katharina Völker für die geduldige Anleitung und Ihre Hilfsbereitschaft zu jeder Zeit danken.

Herzlichen Dank auch Herrn Dipl. Ing. D. Kleinert für die Herstellung der Mikroklemmen in der Versuchswerkstatt der Firma Magnet-Schultz in Memmingen.

Für die fachgerechte Betreuung der Versuchstiere möchte ich Herrn P. Link, Tierpfleger der Universitätsklinik Würzburg danken.

Ganz besonders möchte ich mich bei meiner Mitpromovendin und Freundin D. Kleinert bedanken, die mit ihrer Motivation und ihrem Fleiß wesentlich dazu beigetragen hat, die Versuche und die Arbeit schnell abschließen zu können.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Erler, Johannes Alfred
Geburtsdatum: 11.07.1972
Geburtsort: Memmingen
Konfession: evangelisch
Familienstand: ledig
Eltern: Erler Alfred, Bundesbahnbeamter a. D.
Erler Susanne, geb. Mack, Hausfrau
Geschwister: Erler Ulrike, geb. 12.09.1975

Schulbildung

Grundschule: Sept. 1979 - Juni 1983 Theodor-Heuss-Schule in Memmingen
Gymnasium: Sept. 1983 - Juni 1992 Bernhard-Strigel-Gymnasium in Memmingen
Abschluß im Juni 1992: Abitur mit der Note 1,7

Zivildienst

Nov. 1992 - Januar 1994 tätig im Rettungsdienst beim Bayerischen Roten Kreuz in Memmingen mit Ausbildung zum Rettungssanitäter

Studium

März 1994 - voraussichtl. Juni 2000 Medizinstudium an der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg

bisherige Prüfungen:

20.03.1996	Ärztliche Vorprüfung (Note: 2)
25.03.1997	1. Staatsexamen (Note: 2)
23.03.1999	2. Staatsexamen (Note: 2)
30.05.2000	3. Staatsexamen (Note: 2)

Promotion:

Prof. Dr. E. Heidbreder, Nephrologische Abteilung der Medizinischen Universitätsklinik Würzburg
Thema: Einfluß von Losartan auf das L-Arginin/NO-System im ischämisch akuten Nierenversagen der Ratte

Veröffentlichungen: Lopau K., Kleinert D., Eler J., Schramm L., Heidbreder E., Wanner C.,
Influence of the NO / L-Arginine-system on Tacrolimus-induced changes of
renal hemodynamics, Vortrag am Weltkongress Transplantation 1998,
Montreal

Praktische Erfahrungen

Famulaturen:	9/1996	Klinikum Memmingen, Abteilung für Innere Medizin
	4/1997	Klinikum Memmingen, Abteilung für Anästhesiologie
	8/1997	Universitätsklinik Würzburg, Abteilung für Nephrologie
	3/1998	Chirurgische Praxis Dres. Eckert u. Hüller, Würzburg
	8/1998	Klinikum Memmingen, Abteilung für Innere Medizin
	10/1998	Universitätsklinik Würzburg, Abteilung für Ophthalmologie
sonst. Tätigkeiten:	1994-1996	ehrenamtliche Tätigkeit im Rettungsdienst Memmingen
	1996-1999	regelmäßige Nachtwachen in der Urologischen Universitätsklinik
praktisches Jahr:	4/1999 - 8/1999	1. Tertial: Innere Medizin Spital Walenstadt, Schweiz, Abteilung für Innere Medizin
	8/1999 - 12/1999	2. Tertial: Anästhesie Universitätsklinik Würzburg, Abteilung für Anästhesiologie
	12/1999 - 3/2000	3. Tertial: Chirurgie Universitätsklinik Würzburg, Abteilung für Chirurgie
berufl. Tätigkeiten:	seit 07/2000	Tätigkeit als Arzt im Praktikum Klinikum Memmingen, Medizinische Klinik I

sonstige Erfahrungen

Sprachen: Englisch in Wort und Schrift

EDV/Multimedia: fundierte Kenntnisse im Umgang mit Windows, Word, Excel, versch.
Grafikverarbeitungsprogrammen (Photoshop, Corel-Draw)
Umgang mit Internet
Erstellung von Präsentationen und Videofilmen

Memmingen, den 08.06.01