

**Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik I  
der Universität Würzburg  
Direktor: Professor Dr. med. G. Ertl**

**Der positive Effekt von Indometacin im  
ischämisch bedingten akuten Nierenversagen**

**Inaugural – Dissertation**

**zur Erlangung der Doktorwürde der  
Medizinischen Fakultät  
der  
Julius-Maximilians-Universität Würzburg  
vorgelegt von  
Marcus Meusel  
aus Würzburg**

**Würzburg, Dezember 2012**

**Referent:** Prof. Dr. med. Christoph Wanner

**Koreferent:** Priv.-Doz. Dr. rer. nat. Christoph Sauvant

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

**Tag der mündlichen Prüfung:** 10.12.2012

**Der Promovend ist Arzt.**

**Meiner Familie**



## Abkürzungen

ANV	- Akutes Nierenversagen
bp	- Basenpaare
COX	- Cyclooxygenase
EP	- Prostaglandin E Rezeptor
GFR	- Glomeruläre Filtrationsrate
iANV	- Ischämisch bedingtes akutes Nierenversagen
Indo	- Indometacin
Na <sup>+</sup> -K <sup>+</sup> -ATPase	- Natrium-Kalium-ATPase
NSAR	- Nicht steroidale Antirheumatika
OAT	- Organischer Anionentransporter
PAH	- Para-Aminohippurat
PG	- Prostaglandin
PNS	- PAH Nettosekretion
RBF	- Renaler Blutfluss
RPF	- Renaler Plasmafluss
rt-PCR	- Real-time Polymerasekettenreaktion
TGF	- Tubuloglomerulärer Feedbackmechanismus

# Inhaltsverzeichnis

	Seite
<b>1 Einleitung</b>	1
1.1 Das akute Nierenversagen	1
1.1.1 Definition	1
1.1.2 Epidemiologie	1
1.1.3 Ursachen	2
1.1.4 Verlauf	3
1.1.5 Pathophysiologie	4
1.1.6 Therapie	7
1.2 Cyclooxygenase	8
1.2.1 COX-1 und COX-2	8
1.2.2 Indometacin	9
1.3 Prostaglandine in der Niere	10
1.3.1 Prostaglandinsynthese	11
1.3.2 Wirkung von Prostaglandinen in der Niere	13
1.3.3 Prostaglandine im akuten Nierenversagen	14
1.4 Transport organischer Anionen im proximalen Tubulus der Niere	15
1.5 Arbeitshypothese	17
<b>2 Material und Methoden</b>	18
2.1 Allgemeines	18
2.2 Induktion des ischämisch bedingten akuten Nierenversagens	18
2.3 Probengewinnung und Organentnahme	20
2.4 Gruppeneinteilung der Versuchstiere	21
2.5 Bestimmung der glomerulären Filtrationsrate	22
2.6 Bestimmung des renalen Plasmaflusses	23
2.7 Berechnung der PAH Nettosekretion	24
2.8 Real-time PCR	25
2.9 Western Blot Verfahren	26

2.9.1 Aufarbeitung der Proben	26
2.9.2 Western Blot Analyse	26
2.10 Statistik	28
<b>3 Ergebnisse</b>	<b>29</b>
3.1 Expression von OAT-1 und OAT-3 nach ischämisch bedingtem akuten Nierenversagen	29
3.2 PAH Nettosekretion nach ischämisch bedingtem akuten Nierenversagen	34
3.3 Nierenfunktionsparameter RPF und GFR nach ischämisch bedingtem akuten Nierenversagen	36
<b>4 Diskussion</b>	<b>39</b>
4.1 Allgemeines	39
4.2 Methodik	39
4.3 Expression und Funktion von OAT-1 und OAT-3	40
4.4 Nierenfunktion	42
4.5 Inflammation	44
4.6 Dosisfindung	46
4.7 Ausblick	47
<b>5 Zusammenfassung</b>	<b>49</b>
<b>6 Literaturverzeichnis</b>	<b>50</b>
<b>7 Abbildungs- und Tabellenverzeichnis</b>	<b>65</b>
Danksagung	
Lebenslauf	





# **1 Einleitung**

## **1.1 Das akute Nierenversagen**

### **1.1.1 Definition**

Das akute Nierenversagen (ANV) ist als akut (innerhalb von 48 Stunden) einsetzende, rasche Abnahme der Nierenfunktion, die prinzipiell reversibel ist, definiert.<sup>1-3</sup> Es geht unter anderem mit der Retention harnpflichtiger Substanzen und einer Störung des Flüssigkeits-, Elektrolyt- und Säure-Basen-Haushalts einher.<sup>3,4</sup> Es gab in der klinischen Einteilung des akuten Nierenversagens unterschiedliche Kriterien des ANV, aus denen zuletzt durch das Acute Kidney Injury Network (AKIN) eine international akzeptierte Definition festgelegt wurde. Dabei ist der abrupte Einbruch der exkretorischen Nierenfunktion klinisch als Anstieg um größer gleich 150% bis 200% vom Normbereich bzw. alternativ eine Erhöhung des Serumkreatinins um mehr als 0,3 mg/dl, oder eine Reduktion des Urinvolumens auf weniger als 0,5 ml/kg/h über 6 Stunden definiert.<sup>5</sup> Diese Kriterien des AKIN stellen eine modifizierte Form der 2004 vorgestellten RIFLE-Klassifikation dar, die abhängig von Veränderungen der Serumkreatininwerte und der Diurese das ANV in 5 Kategorien einteilt: Risk, Injury, Failure, Loss of Function und End-Stage Kidney Disease.<sup>6,7</sup> Entscheidend ist jedoch, dass es sich beim akuten Nierenversagen um ein komplexes Syndrom handelt, das sich klinisch mannigfaltig darstellt, vom diskreten Anstieg des Serumkreatinins bis hin zur Dialysepflichtigkeit.<sup>8</sup>

### **1.1.2 Epidemiologie**

Das akute Nierenversagen ist durchaus nicht selten, denn rund 7% aller im Krankenhaus behandelten Patienten erleidet ein ANV<sup>9</sup>, die Inzidenz auf Intensivstationen liegt sogar bei 5-30%.<sup>10,11,12</sup> Damit gehört das akute Nierenversagen zu den häufigsten Organversagen auf der Intensivstation und ist fast immer Bestandteil des Multiorgandysfunktions-Syndroms.<sup>2,13</sup> Besonders

kritisch ist hierbei die mit dem ANV verbundene Morbidität und Mortalität. Bereits ein Anstieg des Serumkreatinins um 0,3 mg/dl, entsprechend dem RIFLE-Kriterium „Risk“, führt zu einer deutlichen Mortalitätszunahme.<sup>14</sup> In vielen Studien, die Patienten mit ANV auf Intensivstation untersuchten, lag die Sterblichkeitsrate meist über 50%.<sup>8,15-17</sup> Die Letalität der dialysepflichtigen Patienten mit ANV auf Intensivstation betrug sogar 50-70%.<sup>18</sup> Wenn die Patienten das akute Geschehen überleben, so besteht immer noch das Risiko einer Chronifizierung. So kommt es in bis zu 4% zu einer chronischen Einschränkung der Nierenfunktion und 10% der Patienten werden Dauerdialysepatienten.<sup>8,10</sup>

### **1.1.3 Ursachen**

Das akute Nierenversagen ist Folge einer Vielzahl von sowohl renalen als auch extrarenalen Erkrankungen. Klinisch wird es in drei Formen unterteilt: das prä-, intra- und postrenale Nierenversagen.<sup>3,4</sup> Eine verminderte Nierenperfusion ist beim prärenalen ANV, welches 60% der akuten Nierenversagen ausmacht, die Ursache für den Funktionsverlust der Nieren. So führen zum Beispiel Hypovolämie, systemische Vasodilatation bei Sepsis oder eine Zytokinvermittelte renale Vasokonstriktion zu einer Verminderung des effektiven Blutdrucks und schließlich zum Nierenversagen. Intrarenale Ursachen sind ebenfalls mannigfaltig. Von besonderer Bedeutung sind vor allem akute Tubulusnekrosen, die ischämisch, septisch oder nephrotoxisch bedingt sein können, sowie akute Glomerulonephritiden oder akute interstitielle Nephritiden. Intrarenale Ursachen sind mit 35% die zweithäufigste Ursache des ANV und liegen somit noch vor den postrenalen Ursachen, die 5% der ANV ausmachen. Postrenal bedingte Nierenversagen beruhen auf einer Harnableitungsstörung, sei es durch Nierensteine, maligne Tumoren oder angeborene Fehlbildungen im Bereich der Nierenbecken, Harnleiter oder Harnröhre.<sup>3,4</sup>

Konzentriert man sich schließlich auf einzelne Krankheitsbilder, so zeigten sich in der Arbeit von Uchino et al. 2005 bei 1726 Patienten mit akutem

Nierenversagen auf Intensivstation folgende Ursachen: septischer Schock (47,5%), kardiogener Schock (26,9%), Hypovolämie (25,6%), Medikamentenvermitteltes Nierenversagen (19%) oder hepatorenales Syndrom (5,7%).<sup>10</sup>

#### **1.1.4 Verlauf**

In der Regel werden beim akuten Nierenversagen vier Phasen durchlaufen: Initialphase, Phase des manifesten Nierenversagens, Phase der Polyurie und Erholungsphase. Dabei birgt jedes Stadium typische Gefahren für den Patienten.

Die Initialphase, die Stunden bis Tage anhält, ist meist asymptomatisch oder von den Symptomen des Grundleidens gekennzeichnet. Die Phase des manifesten Nierenversagens ist durch eine fortbestehende Verminderung der glomerulären Filtrationsrate (GFR) mit progredientem Anstieg der Retentionswerte, wie zum Beispiel Kreatinin und Harnstoff, charakterisiert. Je nach Diuresevolumen wird zwischen oligurischem und nicht oligurischem Verlauf unterschieden.<sup>3</sup> Während dieser Zeit, die 1 - 10 Wochen anhalten kann, besteht aufgrund des Verlusts der Autoregulationsfähigkeit der Niere eine deutlich erhöhte Empfindlichkeit für weitere Nierenschädigungen zum Beispiel durch Minderperfusion infolge von Blutdruckschwankungen. Weiterhin ist der Patient durch systemische Komplikationen wie Lungenödem, gastrointestinalen Blutungen oder Hyperkaliämie und damit verbundenen Herzrhythmusstörungen gefährdet.<sup>3,19,20</sup> Auch besteht die Gefahr von urämisch-neurologischen Symptomen und einem Hirnödem im fortgeschrittenen Bild.<sup>21,22</sup>

Im Falle eines regenerativen Verlaufs schließt sich die polyurische Phase an, die Tage bis Wochen dauern kann. Dieses Stadium ist gekennzeichnet durch den langsamen Rückgang der Urämiesymptome und Zunahme der Harnausscheidung, die sich initial rasch erhöht und auf dem Höhepunkt auch 10 Liter und mehr betragen kann. Eine sehr genaue Gewichts-, Flüssigkeits- und Elektrolytbilanz ist während der polyurischen Phase von besonderer

Bedeutung. Es drohen Komplikationen wie Dehydratation mit Natrium- und Kaliumverlust, Tachykardie, Fieber, Hypotonie, Apathie und Krämpfe.

Setzt schließlich die Erholungsphase ein, bessert sich das Befinden der Patienten mit zunehmender Normalisierung der Retentionswerte. Es kommt in vielen Fällen zur funktionellen Wiederherstellung der Nierenfunktion, wobei Partialfunktionen lange gestört sein können. So dauert es meist 1 - 3 Monate bis das akute Nierenversagen schließlich ganz ausgeheilt ist.<sup>23,24</sup>

### **1.1.5 Pathophysiologie**

Die Pathogenese des akuten Nierenversagens ist auch heute noch nicht komplett verstanden. Es handelt sich um ein komplexes Geschehen, welches eine Vielzahl von Reaktionen beinhaltet. Dazu zählen unter anderem Veränderungen in der renalen Hämodynamik, Endothel- und Tubulusschäden und zahlreiche Inflammationsprozesse.<sup>25-27</sup>

Meist wird das akute Nierenversagen durch eine ischämische Minderperfusion eingeleitet. Der Sauerstoffmangel in den Gefäßendothelien führt zu einem Anstieg des zytosolischen Calciums und damit zur Vasokonstriktion. Zusätzlich wird durch den ischämisch bedingten Endothelschaden die Produktion von vasodilatatorischen Substanzen wie NO oder Prostaglandinen vermindert.<sup>25</sup> Daraus folgt ein erhöhter Widerstand in den Vasa afferens und efferens der Glomeruli.<sup>28</sup> Somit sinkt der Blutfluss im Glomerulus, was wiederum den effektiven Filtrationsdruck und die glomeruläre Filtrationsrate herabsetzt.<sup>29</sup> Außerdem kommt es in der gesamten Niere zu einer erhöhten Sensibilität für Vasokonstriktoren und nervale Stimuli.<sup>30,31</sup> Dies führt schließlich zu einem Unvermögen zur Autoregulation des renalen Blutflusses.

Weiterhin triggert die Ischämie eine komplexe Schädigung des Zellmetabolismus. Die ATP-Speicher werden aufgebraucht, freie Radikale gebildet und zahlreiche Enzyme wie Phospholipasen, Proteasen oder Endonukleasen werden aktiviert.<sup>4</sup> Der ATP-Mangel hat zur Folge, dass Veränderungen im

Zytoskelettgefüge und in den Zell-Zell-Adhäsionen entstehen.<sup>32</sup> Die Zelle verliert ihre Polarität, die transzelluläre Permeabilität wird erhöht und Natrium-Kalium-ATPasen ( $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ -ATPasen) werden zur apikalen Membran umverteilt.<sup>1,33-35</sup> Die Fähigkeit, gezielt Natrium und Wasser zu resorbieren, geht verloren. Durch die so erhöhten Konzentrationen an Natrium und Chlorid an der Macula densa kommt es durch den tubuloglomerulären Feedbackmechanismus (TGF) zu einer weiteren Einschränkung der glomerulären Filtrationsrate (GFR), die bis zu 50% betragen kann.<sup>33,36</sup>

Morphologisch äußert sich das Geschehen in einem Verlust der Bürstensaummembran, einem Anschwellen der Zellen und dem Ablösen der Tubuluszellen von der Basalmembran hin zu einer intraluminalen Aggregation von Proteinen und Zellresten und somit einer Tubulusobstruktion.<sup>34,37</sup> Dies führt zum parazellulären Übertritt des Primärharns in das peritubuläre Interstitium, was als „back-leak“ bezeichnet wird und die Nierenschädigung weiter vorantreibt.

Besonders anfällig für eine Ischämie ist der Außenstreifen des äußeren Marks der Niere, in der das S3-Segment des proximalen Tubulus und der dicke, aufsteigende Teil der Henle-Schleife lokalisiert ist. In diesem Nierenabschnitt liegt bereits unter physiologischen Bedingungen eine grenzwertig limitierte Perfusion vor, die während eines ischämischen Ereignisses durch nochmalige Reduktion von Blutfluss und somit auch Oxygenierung weiter herabgesetzt ist.<sup>38,39</sup>

Neben den Tubulusepithel- und Endothelzellen sind vor allem auch Leukozyten an der Pathogenese des akuten Nierenversagens beteiligt.<sup>40</sup> In den Endothelzellen werden zahlreiche Adhäsionsmoleküle für Leukozyten hochreguliert, die wiederum die Inflammationsprozesse modulieren.<sup>41</sup> Nach Adhäsion und Chemotaxis setzen die Leukozyten reaktive Sauerstoffspezies und Enzyme frei, die die umliegenden Zellen schädigen.<sup>34</sup> So führen zum Beispiel reaktive Sauerstoffspezies zu Denaturierungen von Proteinen und DNA-Abbrüchen.<sup>42</sup> Weiterhin bilden Leukozyten Vasokonstriktoren, wie Leukotriene und Thromboxane, schädigen das Endothel durch potente

Freisetzung von Endothelin, einem weiteren hochpotenten Vasokonstriktor, oder durch die Reduzierung der funktionellen NO-Konzentration im Rahmen eines Radikal-Scavenging (Abb. 1).<sup>43,44</sup>

Trotz alledem ist die Niere in der Lage eine solche Schädigung zu kompensieren und sich zu regenerieren. Tubuluszellen, die das akute Nierenversagen überlebt haben, sind hierbei in der Lage sich erneut zu teilen und an Stellen zu migrieren, an denen die Basalmembran frei liegt. Sie dedifferenzieren und proliferieren, um die Zellzahl wieder herzustellen und differenzieren dann wieder, um schließlich ihre Funktion wieder aufzunehmen.<sup>45</sup> So ist es möglich, dass nach einer Erholungsphase (siehe 1.1.4 Verlauf) die Nierenfunktion allmählich wiederhergestellt wird. In welchem Ausmaß dies geschieht, hängt vor allem von der Dauer und Intensität des Nierenversagens ab.

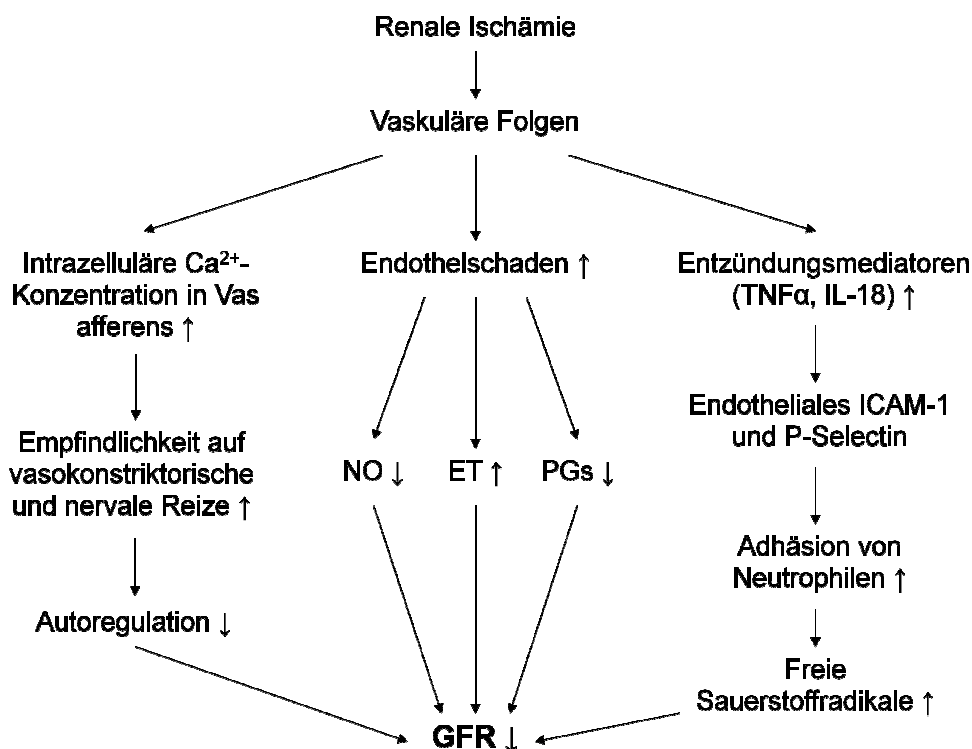


Abb. 1: Vaskuläre Faktoren, die zur Pathogenese des ANV beitragen. NO: Stickstoffmonoxid, ET: Endothelin, PG: Prostaglandin (nach Schrier, R.W. 2004)

### 1.1.6 Therapie

Obwohl bei der Aufklärung pathophysiologischer Vorgänge des akuten Nierenversagens in den letzten Jahren große Fortschritte gemacht wurden, sind die therapeutischen Möglichkeiten immer noch begrenzt. Bisher konnte für keine spezifische medikamentöse Therapie in klinischen Studien am Menschen ein eindeutiger Wirkungsnachweis erbracht werden. Es haben sich weder Dopamin zur Durchblutungsförderung noch Diuretika zur Verbesserung der Nierenfunktion in klinischen Studien bewährt.<sup>46,47</sup> Auch neuere klinische Therapieansätze mit atrialem natriuretischen Peptid (ANP) oder „insulin-growth factor-1“ (IGF-1) zeigen keinen positiven Effekt auf die Nierenfunktion im ANV.<sup>48</sup>

So stellen supportive Maßnahmen immer noch die Eckpfeiler der Therapie des ANV dar. Von zentraler Bedeutung sind die rasche Normalisierung des Hydratationszustands und die Optimierung der Herz-Kreislauf-Funktion. Nephrotoxische Medikamente sollten vermieden bzw. die Dosis der eingeschränkten Nierenfunktion angepasst werden. Weitere wichtige Faktoren im Rahmen der Behandlung sind das Erkennen und Therapieren von Störungen des Elektrolyt- und Säure-Base-Haushaltes, sowie die Behandlung der auslösenden Erkrankung wie zum Beispiel eine Infektion oder eine postrenale Obstruktion.<sup>49</sup>

*Es wird deutlich, dass immer noch ein großer Forschungsbedarf im Bereich der Therapiemöglichkeiten besteht. Um einen neuen Ansatz der Therapie des akuten Nierenversagens zu entwickeln, schien eine genauere Untersuchung des Prostaglandin E<sub>2</sub> sinnvoll. Es ist nicht nur an der renalen Hämodynamik und Entzündungsprozessen beteiligt, sondern auch auf zellulärer Ebene als Regulator von zahlreichen Zellprozessen aktiv.<sup>50-52</sup> Im Folgenden wird nun zunächst auf die Cyclooxygenase, als Enzym, das die Bildung von Prostaglandinen katalysiert, eingegangen, um dann das Prostaglandin E<sub>2</sub> genauer zu charakterisieren.*

## 1.2 Cyclooxygenase

Für die Umwandlung von Arachidonsäure in die einzelnen Eicosanoide wie zum Beispiel Prostaglandin E<sub>2</sub> oder Thromboxan A<sub>2</sub> ist das Enzym Cyclooxygenase (COX) von entscheidender Bedeutung. Es existieren zwei Isoformen dieses Hämoproteins: COX-1 und COX-2.

### 1.2.1 COX-1 und COX-2

COX-1 und COX-2 unterscheiden sich in ihrer Gewebsverteilung und Expression, ähneln sich jedoch in der Größe (71kD), Substratspezifität und Kinetik.<sup>53,54</sup> Man geht davon aus, dass COX-1 in fast allen Zellen vorkommt, also konstitutiv ist und an physiologischen Funktionen wie zum Beispiel der Schleimhautprotektion des Magens, der vaskulären Homöostase oder der Aggregationsförderung in den Thrombozyten beteiligt ist.<sup>55,56</sup> Ebenso fördern durch COX-1 synthetisierte Prostaglandine, wie Prostaglandin E<sub>2</sub> und Prostaglandin I<sub>2</sub>, die NaCl- und H<sub>2</sub>O-Ausscheidung und die Nierendurchblutung.<sup>53</sup> Der COX-2 hingegen werden schädigende, pathophysiologische Funktionen zugeschrieben. Sie wird beispielsweise bei Inflammation, Fieber, anaphylaktischem Schock oder Apoptose verstärkt exprimiert und ist somit bei Entzündungsprozessen von entscheidender Bedeutung.<sup>57,58</sup> Sie gilt als induzierbare Isoform der Cyclooxygenasen. Allerdings besitzt auch COX-2 wichtige physiologische Aufgaben. Gewebsabhängig kommt dieses Enzym konstitutiv hauptsächlich in der Niere, in der Magenwand und im Hinterhorn des Rückenmarks vor.<sup>53</sup>

Für das akute Nierenversagen steht in therapeutischer Hinsicht vor allem die Hemmung der durch die Cyclooxygenasen vermittelten, schädigenden Mechanismen im Vordergrund. Als Hemmstoffe der COX sind besonders die nicht steroidal Antirheumatika (NSAR) hervorzuheben. Diese Pharmaka haben die ausgeprägte Eigenschaft, die Entstehung von Prostaglandinen und anderen Eicosanoiden zu inhibieren.<sup>59</sup> So wirken sie schmerzlindernd, fiebersenkend und zum größten Teil auch entzündungshemmend. Die



„klassischen“ Antirheumatika hemmen beide Cyclooxygenasen in unterschiedlicher Isoform-Spezifität. Im klinischen Einsatz ist die Hemmung der durch die COX-2 synthetisierten Derivate der Arachidonsäure von maßgeblicher Bedeutung. Abgeleitet von den genannten physiologischen Funktionen der COX-2 ergeben sich hieraus die gewünschten Wirkungen, aber auch Nebenwirkungen. Zu nennen sind eine Schädigung der Magenschleimhaut, eine Verminderung der Nierendurchblutung, sowie eine Neigung zur Hybernatriämie mit Wasserretention und Ödembildungen.<sup>60</sup>

*In dieser Arbeit wird Indometacin als typisches NSAR zur Hemmung der Cyclooxygenasen verwendet. Im Folgenden soll auf diese Substanz näher eingegangen werden.*

### 1.2.2 Indometacin

Indometacin als ein nicht-selektiver COX-Inhibitor zählt zu den amphiphilen Säuren. Der eigentliche chemische Name lautet 2-[1-(4-Chlorbenzoyl)-5-methoxy-2-methyl-1H-indol-3-yl]essigsäure mit der Summenformel:  $C_{19}H_{16}ClNO_4$ . Die Strukturformel ist in Abbildung 2 dargestellt. Bei einer molaren Masse von 357,8 g/mol liegt die Plasmahalbwertszeit etwa bei 4,5 Stunden, wobei Indometacin sowohl renal als auch bilär ausgeschieden wird. Die Plasma-Eiweißbindung ist mit ca. 90% relativ hoch.<sup>61</sup>

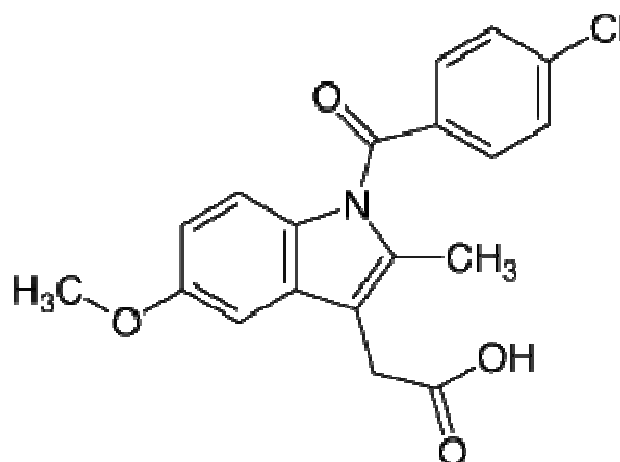


Abb. 2: Strukturformel von Indometacin

Indometacin ist ein nicht-selektiver COX-Inhibitor, das heißt sowohl COX-1 als auch COX-2 werden gehemmt. Dabei ist jedoch die inhibitorische Potenz gegenüber COX-1 größer. So liegt der IC<sub>50</sub> von Indometacin im „WHRI blood/A549 cell assay“ für COX-1 bei 0.018 µM und für COX-2 bei 0.048 µM.<sup>54,62</sup> Die Hemmung erfolgt zeit- und konzentrationsabhängig, sowie funktionell irreversibel.<sup>63-65</sup>

Die Hauptindikationen für den klinischen Einsatz von Indometacin sind Erkrankungen des rheumatischen und skelettal degenerativen Formenkreises. Weiterhin ist es ein Mittel der Wahl bei einem akuten Gichtanfall und wird ebenfalls zum medikamentösen Verschluss eines persistierenden Ductus arteriosus bei Frühgeborenen eingesetzt. Die Nebenwirkungen lassen sich wiederum an den physiologischen Aktivitäten der COX-Isoformen ableiten. Da eine stärkere COX-1 Inhibition stattfindet, sind die damit verbundenen unerwünschten Effekte stärker ausgeprägt. So finden sich am häufigsten Beschwerden im Magen-Darm-Trakt durch Schädigung der Schleimhaut, Kopfschmerzen und Schwindel, sowie seltener renal bedingte Ödeme, Störungen der Leberfunktion oder das Auslösen von Bronchialasthma.<sup>66</sup>

*Nachdem die Cyclooxygenase als Schlüsselenzym der Prostaglandinsynthese vorgestellt wurde, soll nun das Eicosanoid Prostaglandin vor allem mit seiner Funktion in der Niere genauer betrachtet werden.*

### **1.3 Prostaglandine in der Niere**

Prostaglandine (PG) sind eine Gruppe von Gewebshormonen, die aus der Metabolisierung der Arachidonsäure durch Cyclooxygenasen entstehen.<sup>52</sup> Es sind intra- und extrazelluläre Signalstoffe, die von jeder Zelle gebildet werden können und denen eine Reihe von regulativen Funktionen zukommt. So beeinflussen Prostaglandine zum Beispiel multiple zelluläre Prozesse wie die Zellproliferation oder -dedifferentiation, aber auch die Homöostase, den Schutz der Magenmukosa oder die Nierenfunktion.<sup>52,54,67,68</sup> Weiterhin spielen sie bei

der Pathophysiologie von Inflammation, Schmerz und Bluthochdruck eine bedeutende Rolle.<sup>52,57,67,68</sup>

Die Funktion der Prostaglandine wird auf verschiedenen Ebenen reguliert, einerseits durch ihre Bildung mittels Cyclooxygenasen und andererseits auf Ebene der verschiedenen Prostaglandinrezeptoren.<sup>68-70</sup> Man unterscheidet verschiedene Unterformen der Prostaglandine nach Struktur, Bildung, Vorkommen, Wirkung und Regulation, die da wären: Prostaglandin H<sub>2</sub> (PGH<sub>2</sub>), Prostaglandin D<sub>2</sub> (PGD<sub>2</sub>), Prostaglandin I<sub>2</sub> (PGI<sub>2</sub>), Prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) und Prostaglandin F<sub>2α</sub> (PGF<sub>2α</sub>). Hierbei ist besonders PGE<sub>2</sub> hervorzuheben. Es ist das am häufigsten vorkommende Prostaglandin mit einer Vielzahl von Wirkungen und Einflüssen auf die Pathophysiologie zahlreicher Erkrankungen wie zum Beispiel das akute Nierenversagen.<sup>69</sup> Ist man in der Lage diese Mechanismen zu verstehen, ist es prinzipiell möglich neue Therapieformen zu entwickeln.

### 1.3.1 Prostaglandinsynthese

Die Prostaglandinsynthese erfolgt in mehreren Schritten (Abb. 3). Zunächst wird Arachidonsäure, eine 4fach ungesättigte Fettsäure (5, 8, 11, 14-Eicosatetraensäure), durch das Enzym Phospholipase A<sub>2</sub> von den Phospholipiden der Zellmembran, zum Beispiel dem Phosphatidylcholin (Lecithin), abgespalten. Es folgt die Synthese von Prostaglandin H<sub>2</sub> in einem zweistufigen Enzymprozess, bei dem zunächst die Arachidonsäure durch die *bis*-Oxygenase-Aktivität der COX in das instabile Zwischenprodukt Prostaglandin G<sub>2</sub> (PGG<sub>2</sub>) umgewandelt und dann PGH<sub>2</sub> durch die Peroxidase-Aktivität der COX gebildet wird.<sup>68</sup> Danach wird PGH<sub>2</sub> in stabilere, biologisch aktive Formen wie zum Beispiel PGE<sub>2</sub>, PGI<sub>2</sub>, PGF<sub>2α</sub> oder Thromboxan A<sub>2</sub> metabolisiert. Im Falle des Prostaglandin E<sub>2</sub> wird dieser Schritt durch die PGE-Synthase katalysiert.<sup>69</sup>

Aufgrund des raschen Abbaus nach der Synthese (HWZ ca. 1min) ist der Effekt der Prostaglandine auf die unmittelbare Umgebung limitiert. So wirken sie meist

auto- oder parakrin. Dabei bindet jedes Prostaglandin an seinen eigenen, spezifischen Rezeptor. Für Prostaglandin E<sub>2</sub> sind vier verschiedene Subtypen nämlich Prostaglandin E Rezeptor 1 - 4 (EP 1 - 4) beschrieben. Sie sind alle G-Protein-gekoppelt, erfüllen aber je nach Signalweg unterschiedliche Aufgaben.<sup>70,71</sup> In der Niere sind diese Signalwege noch wenig erforscht. Es gibt jedoch Anzeichen dafür, dass zum Beispiel der EP4-Rezeptor an der Regulation der glomerulären Hämodynamik beteiligt ist oder dass die Aktivierung des EP1-Rezeptors einen möglichen natriuretischen Effekt im Sammelrohr der Niere hat.<sup>72,73</sup>

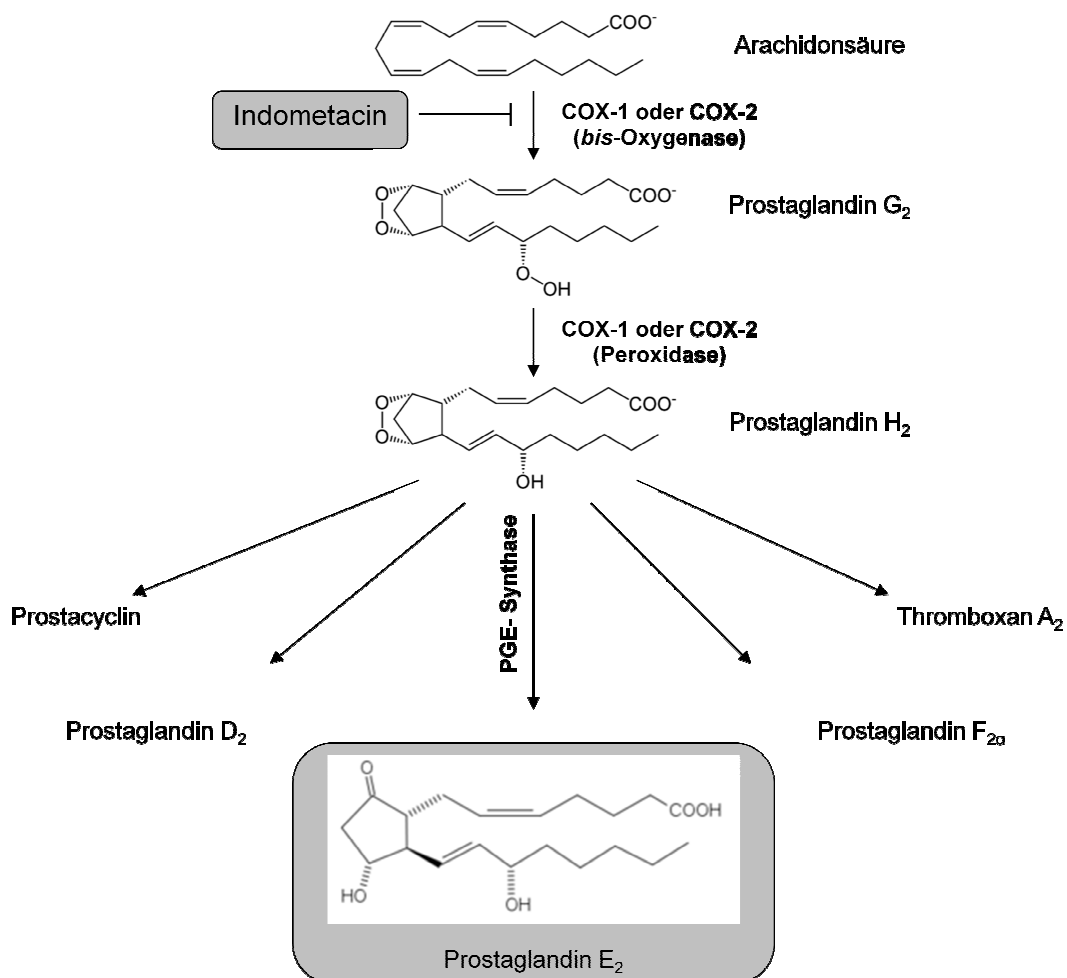


Abb. 3: Prostaglandin E<sub>2</sub> Synthese

### 1.3.2 Wirkung von Prostaglandinen in der Niere

Es ist bekannt, dass Prostaglandine eine bedeutende Rolle bei der Modulation der glomerulären Filtrationsrate (GFR) und des renalen Blutflusses spielen (RBF).<sup>74-76</sup> Unter physiologischen Bedingungen beeinflussen Prostaglandine die GFR und den RBF kaum. Doch unter bestimmten pathophysiologischen Verhältnissen, wie zum Beispiel einem verminderten effektiven arteriellen Blutfluss oder einem nephrotischen Syndrom, wird der Erhalt der normalen Nierenfunktion von Prostaglandinen abhängig („rescue“-Funktion).<sup>75-77</sup>

Zum einen wirken Prostaglandine, vor allem PGE<sub>2</sub> und PGI<sub>2</sub>, durch ihren vasodilatatorischen Effekt als Gegenspieler zu endogenen vasokonstriktorisches Substanzen wie Katecholaminen, Angiotensin oder Vasopressin.<sup>78</sup> So kann endogen gebildetes Prostaglandin E<sub>2</sub> beispielsweise die GFR durch eine Vasodilatation der präglomerulären Arteriolen aufrecht erhalten.<sup>79</sup> Andererseits bewirkt Prostaglandin E<sub>2</sub>, das in der Macula densa gebildet wird, einen Anstieg der Reninfreisetzung, was dazu führt, dass Angiotensin II vermehrt vorliegt.<sup>80</sup> Dieses Angiotensin II wiederum führt zu einer Vasokonstriktion der postglomerulären Arteriolen, wodurch letztendlich der effektive Filtrationsdruck in den Glomeruli steigt und somit die GFR ebenfalls aufrecht erhalten wird.<sup>81,82</sup>

Die Wirkung der Prostaglandine beschränkt sich jedoch nicht nur auf die glomeruläre Filtrationsrate, sondern ist durchaus umfassender. So haben Prostaglandine, wie PGE<sub>2</sub> und PGI<sub>2</sub>, die im Nierenmark gebildet werden, entscheidenden Einfluss auf die Natriumexkretion und die Durchblutung dieses Nierenabschnittes.<sup>51</sup> Sie werden durch interstitielle Zellen im Nierenmark gebildet, inhibieren die tubuläre Natriumreabsorption und erhöhen den renalen medullären Blutfluss.<sup>83</sup> Eine Reduktion des renalen medullären Blutflusses durch selektive COX-Inhibition verursacht eine Natriumretention und somit Bluthochdruck.<sup>84,85</sup> Die Durchblutung des Nierenkortex ist jedoch wenig abhängig von Prostaglandin E<sub>2</sub>.

### 1.3.3 Prostaglandine im akuten Nierenversagen

Bei der Pathophysiologie des akuten Nierenversagens scheint vor allem die veränderte Bildung von parakrin wirkenden Substanzen eine entscheidende Rolle zu spielen. So ist bekannt, dass Stickstoffmonoxid (NO) im akuten Geschehen vermehrt gebildet wird und inflammatorische Proteine wie TNF- $\alpha$ , IL-6 und IL-1 $\beta$  in der Niere vermehrt synthetisiert werden.<sup>86,87</sup> Weiterhin gibt es zahlreiche Hinweise dafür, dass Prostaglandin E<sub>2</sub> nach ischämisch bedingtem akuten Nierenversagen vermehrt im Nierenkortex vorliegt.<sup>88,89</sup> Auch bei chronischer renaler Ischämie konnten höhere Prostaglandin E<sub>2</sub> Konzentrationen in der Niere gefunden werden.<sup>90</sup> Weiterhin zeigte sich im postrenal bedingten Nierenversagen durch Verschluss des Ureters eine erhöhte Prostaglandin E<sub>2</sub> Synthese in renalen interstitiellen Markzellen.<sup>91</sup> Man konnte nachweisen, dass die Expression von COX-2 und die Bildung von Prostaglandin E<sub>2</sub> in diesen Zellen vor dem Zelltod (Apoptose) schützen.<sup>92</sup> Somit stellt Prostaglandin E<sub>2</sub> vor allem im Nierenmark, indem auch das bereits erwähnte S3-Segment des proximalen Tubulus liegt, einen entscheidenden Faktor zum Zellüberleben dar.

Neben ischämischem oder mechanischem Stress führt auch die Inflammation zu erhöhter Prostaglandin E<sub>2</sub> Synthese. Es konnte gezeigt werden, dass die PGE-Synthase von dem pro-inflammatorischen Protein IL-1 $\beta$  hochreguliert wird.<sup>93</sup> Es ist somit sehr wahrscheinlich, dass Prostaglandine eine wesentliche Rolle in der Pathophysiologie des akuten Nierenversagens spielen.

*Damit sind nur einige bedeutende Funktionen der Prostaglandine in der Physiologie und Pathophysiologie der Niere genannt. Eine besonders interessante und im Hinblick auf das akute Nierenversagen pathophysiologisch relevante Funktion des Prostaglandin E<sub>2</sub> soll nun im nächsten Abschnitt näher dargestellt werden.*

#### 1.4 Transport organischer Anionen im proximalen Tubulus der Niere

Der proximale Tubulus der Niere besitzt aktive Transportmechanismen für die Ausscheidung endogener und exogener Substrate. Dazu zählen nicht nur Toxine und zahlreiche Pharmaka wie ACE-Hemmer, Penicillin-Antibiotika, Cyclosporin A als bedeutendes Zytostatikum oder auch nicht steroidale Antirheumatika wie Paracetamol oder Indometacin, sondern auch endogene Stoffe wie zum Beispiel Prostaglandin E<sub>2</sub> oder Serotonin.<sup>94</sup> Bei der Exkretion dieser Substanzen spielt vor allem das organische Anionentransportsystem eine wesentliche Rolle.<sup>95,96</sup> Dieses System besteht aus organischen Anionentransportern (OAT), die an der basolateralen Seite der proximalen Tubuluszelle lokalisiert sind, und einem apikal gelegenen Effluxschritt, der durch eine Vielzahl verschiedener Transportproteine, beispielsweise der ATP-abhängigen Konjugatpumpe MRP2 (multidrugresistanceprotein), vermittelt wird.<sup>97,98</sup> Da für die vorliegende Arbeit vor allem der geschwindigkeitsbestimmende basolaterale Aufnahmeschritt entscheidend ist, wird auf den apikalen Effluxschritt nicht weiter eingegangen. Den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt bei der Sekretion der organischen Anionen vermitteln die OAT OAT-1 und OAT-3.<sup>99,100</sup> Sie nehmen organische Anionen vom Blut in die Tubuluszelle im Austausch gegen Dicarboxylate wie zum Beispiel Succinat<sup>2-</sup> und  $\alpha$ -Ketoglutarat<sup>2-</sup> auf (Abb. 4). Letzteres stammt aus dem Glutamin-Stoffwechsel der Zelle oder wird vom hNaDC-1-Carrier (human Na<sup>+</sup>-dicarboxylate transporter) sekundär aktiv zusammen mit 3 Na<sup>+</sup>-Ionen in die Zelle aufgenommen. Da die ebenfalls basolateral gelegene Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase den zellwärts gerichteten Na<sup>+</sup>-Gradienten aufbaut, spricht man so von einem tertiär-aktiven Transport.<sup>101</sup> Zusammenfassend kann man sagen, dass der basolaterale polyspezifische Anionentransport von OAT-1 und OAT-3 vermittelt wird und dies der geschwindigkeitsbestimmende Schritt bei der Exkretion von organischen Anionen wie zum Beispiel Prostaglandin E<sub>2</sub> darstellt.

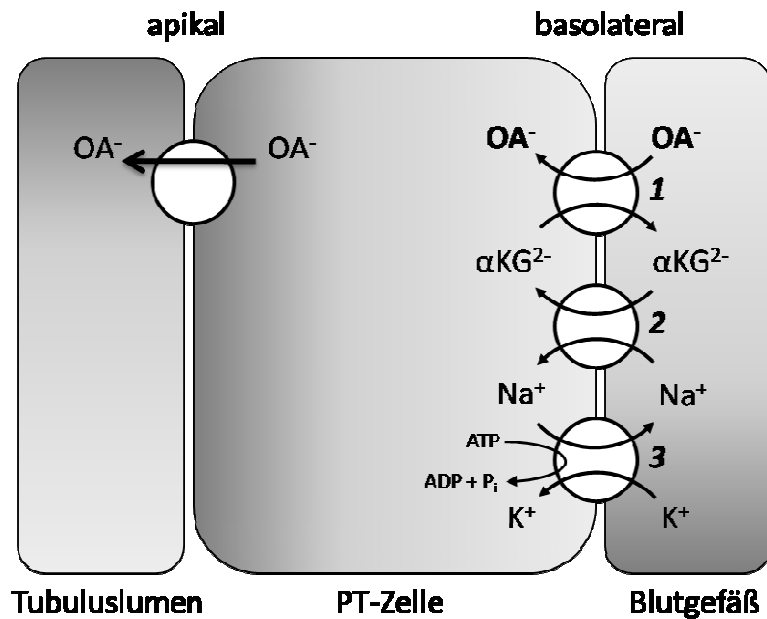


Abb. 4: Transport organischer Anionen im proximalen Tubulus der Niere. 1: Organischer Anionentransporter, 2: hNaDC-1-Carrier, 3:  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ , OA: Organisches Anion,  $\alpha\text{KG}^{2-}$ :  $\alpha\text{-Ketoglutarat}^{2-}$

In den Lehrbüchern wird davon ausgegangen, dass die renale Sekretion organischer Anionen im proximalen Tubulus ständig auf einem gleich hohen Niveau verläuft. Aus diesem Grund wird die renale Clearance organischer Anionen auch als Maß der renalen Perfusion angesehen.<sup>102,103</sup> Tatsächlich gibt es immer mehr Belege dafür, dass dieser organische Anionentransport reguliert wird. Viele Studien konzentrieren sich hierbei auf akute Regulationsmechanismen.<sup>104,105</sup> So fand man, dass Sexualhormone den organischen Anionentransport modulieren<sup>106</sup>, hauptsächlich durch die Regulation der OAT-1 und OAT-3.<sup>107,108</sup> Außerdem wurde gezeigt, dass eine Hyperurikämie die OAT-1 und OAT-3 herunter reguliert.<sup>109,110</sup> In der Rattenniere hat ebenfalls der induzierte Ureterverschluss zu einer Herunterregulation der letztgenannten Transporter geführt.<sup>111</sup> Schneider et al. 2007 konnten weiterhin zeigen, dass die Expression von OAT-1 und OAT-3 in der Reperfusionsphase nach ischämisch bedingtem akuten Nierenversagen (iANV) vermindert ist und dieses mit einer



verminderten Sekretion organischer Anionen einhergeht.<sup>112</sup> Dies konnte auch von anderen Forschungsgruppen bestätigt werden.<sup>113,114</sup>

Sauvant et al. 2006 konnten zusätzlich demonstrieren, dass Prostaglandin E<sub>2</sub>, als endogenes Substrat der OAT-1 und OAT-3, in der proximalen Tubuluszelllinie NRK-52E zu einer Expressionsabnahme der genannten Transporter führt.<sup>115</sup>

## 1.5 Arbeitshypothese

In vorrausgehenden Studien konnte also gezeigt werden, dass (A) OAT-1 und OAT-3 im ischämisch bedingten akuten Nierenversagen herunter reguliert werden und deren Funktion ebenfalls abnimmt.<sup>112</sup> Ferner (B) führte Prostaglandin E<sub>2</sub> in der Zellkultur zu einer Herunterregulation dieser Transporter.<sup>115</sup> Auch weiß man, dass (C) PGE<sub>2</sub> vermehrt im Nierenkortex nach iANV vorliegt.<sup>88,89</sup> Und schließlich gibt es (D) einzelne Hinweise darauf, dass eine Hemmung der Bildung von Prostaglandin E<sub>2</sub> positive Auswirkungen auf die renale Funktion nach Ischämie und Reperfusion („Outcome“) hat.<sup>116,117</sup>

Aufgrund auf all dieser Daten (A bis D) ergibt sich folgende Arbeitshypothese: PGE<sub>2</sub> führt auch in-vivo zu einer verminderten Expression der OAT-1 und OAT-3 nach ischämisch bedingten akuten Nierenversagen. Wenn dies der Fall ist, sollte eine Inhibition der PGE<sub>2</sub>-Bildung die Herunterregulation aufheben oder zumindest vermindern. So ist es das Ziel dieser Arbeit den Effekt des nicht-selektiven COX Inhibitors Indometacin auf die Expression der eben genannten Transporter zu untersuchen. Von Interesse ist jedoch nicht nur die Expression der OAT-1 und OAT-3, sondern auch deren Funktion als wichtiger Teil des renalen Exkretionsapparates, sowie die Effekte auf die gesamte Nierenfunktion, die durch die glomeruläre Filtrationsrate (GFR) und den renalen Plasmafluss (RPF) gemessen werden soll.

## **2 Material und Methoden**

### **2.1 Allgemeines**

Das ischämisch bedingte akute Nierenversagen wurde durch bilaterales Abklemmen der Arteriae renales über einen Zeitraum von 45 Minuten induziert. Als Versuchstiere dienten weibliche Sprague Dawley Ratten (Körpergewicht 200-250g, n= 54), die von der Firma Charles River (Sulzfeld, Deutschland) bezogen wurden. Eine artgerechte Tierhaltung mit geregelter Raumtemperatur, einem konstanten Hell-Dunkel-Zyklus und freiem Zugang zu Trinkwasser und Futter war stets gewährleistet. Die Tötung der Tiere erfolgte ebenfalls nach den Richtlinien für Versuchstiere, entsprechend den Empfehlungen der FELASA (Federation of European Laboratory Animal Science Associations).

### **2.2 Induktion des ischämisch bedingten akuten Nierenversagens**

Die Narkose des Versuchstieres wurde durch eine intraperitoneale Applikation von Ketaminhydrochlorid (100 mg/kg KG, Ketavet<sup>®</sup>, Pharmacia & Upjohn GmbH, Erlangen) und Xylazinhydrochlorid (10 mg/kg KG, Rompun<sup>®</sup> 2%, Bayer Vital GmbH, Leverkusen) durchgeführt.

Nach dem Wiegen wurden beide Flanken der Ratte rasiert und das Tier in Rechtsseitenlage auf einer Wärmeplatte (Typ 12511, Medax, Nagel GmbH, Kiel) fixiert. Die Augen wurden mit Dexpanthenol-Salbe (Bepanthen<sup>®</sup>, Hoffmann- La Roche AG, Grenzach-Wyhlen) versorgt, um eine Austrocknung zu vermeiden. Weiterhin wurde das Operationsfeld sorgfältig mit Povidon-Iod (Braunol<sup>®</sup>, B.Braun Melsungen AG, Melsungen) desinfiziert.

Nach erneutem Prüfen der Narkosetiefe wurden 1 cm paravertebral knapp unterhalb des Rippenbogens die Haut- und Muskelschichten in einem 2 cm langen Schnitt eröffnet, sodass man nun freie Sicht auf die Niere in ihrer Fettkapsel erhielt. Ein Retraktor wurde eingesetzt und die Mobilisierung der

Niere aus dem umliegenden Fettgewebe begann. War dies gelungen, wurde unter Schonung der Niere das Gefäßbündel im Hilusbereich freigelegt und die Nierenarterie von Nierenvene und Harnleiter getrennt. Ein Faden wurde nun provisorisch um die Arterie gelegt, um später das Gefäß rasch wiederfinden und für die Gefäßklemme anheben zu können. Nach einem provisorischen Wundverschluss wurde das Tier auf die linke Seite gedreht und wieder fixiert. In analoger Vorgehensweise wurde auch auf dieser Seite die Nierenarterie freipräpariert und mit einer Ligatur markiert. Nun konnte man zeitnah die Mikro-Gefäßclips (Biemer, 8mm, Medicon Instrumente, Fa. Seidel, Buchendorf) auf beide Arteriae renales setzen.

Es folgte eine Ischämiephase von 45 Minuten. Gegen Ende der Ischämiezeit wurde dem Tier 2,5 ml/kg KG NaCl-Lösung (0,9%) intraperitoneal injiziert, um den perioperativen Flüssigkeitsverlust durch zum Beispiel Verdunstung über die Wundflächen entgegenzuwirken. Nach Ablauf der Ischämiephase wurden die Gefäßklemmen wieder entfernt und so die Reperfusion der Nieren eingeleitet. Die Muskelschicht wurde mit einer fortlaufenden Naht und die Hautschicht mit Einzelknopfnähten versorgt (Nahtmaterial, DS 16 Polyester, Größe 4-0, Medipoint, Hamburg).

Um postoperativ eine Analgesie zu gewährleisten, wurde dem Tier Tramadolhydrochlorid (2mg/kg KG, Tramal<sup>®</sup>, Grünenthal GmbH, Aachen) sowie NaCl-Lösung (0,9%, 1ml/kg KG) zur Flüssigkeitssubstitution subkutan injiziert.

Nach einer 24-stündigen Erholungsphase erfolgte dann die zweite Operation mit Clearancemessung, sowie anschließender Probengewinnung und Organentnahme.

### 2.3 Probengewinnung und Organentnahme

Für diesen operativen Eingriff wurden das Tier analog zur ANV Induktion anästhesiert, gewogen und auf einer Wärmeplatte in Rückenlage fixiert. Anschließend wurde die Halsregion mit Propan-2-ol (72 Vol. %, Cutasept<sup>®</sup> F, Bode Chemie, Hamburg) desinfiziert und eröffnet, um die Halsgefäße darzustellen. Nach dem Freipräparieren der V. jugularis wurde ein Katheter (Polyethylen, Außendurchmesser 1mm) in das Gefäß eingeführt und fixiert. Nun begann die Infusionsphase, bei der eine PAH-Inulin-Lösung mit einem Applikationsvolumen von 0,12ml/min über einen Perfusor (Perfusor<sup>®</sup> F, B.Braun Melsungen AG) für 30 Minuten infundiert wurde. Die PAH-Inulin-Lösung wurde bereits im Vorfeld aus FITC-Inulin (2mg/ml, Fluoreszein-Isothiozyanat markiertes Inulin, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim) und PAH (2mg/ml, para-Aminohippurat, Sigma-Aldrich Chemie GmbH) gelöst in NaCl-Lösung (0,9%) hergestellt.

Nach Beginn der Infusionsphase erfolgte zusätzlich ein 1 cm langer Medianschnitt knapp oberhalb der Symphyse, um die Harnblase extraabdominell in einer befeuchteten Kompresse zu lagern, mit einem 2 mm großen Schnitt zu eröffnen und darin einen Blasenkatheter zu fixieren. Nach Legen des Katheters wurde die Blase wieder sanft in den Bauchraum zurückgeführt, um keine Zugkräfte auf die Blase entstehen zu lassen. Nach Abschluss der 30-minütigen Infusionsphase folgte die 20-minütige Messphase. Hierbei lief die PAH-Inulin-Infusion weiter, jedoch wurde jetzt der Urin vom Blasenkatheter in ein Reagenzglas geleitet, um den Urin zu sammeln.

Nach Ablauf der 20 Minuten wurde das Reagenzglas wieder vom Blasenkatheter entfernt und der Urin zur weiteren Untersuchung bei -20°C asserviert. Daraufhin wurde das Abdomen der Ratte mit einem Längsschnitt von kaudal in Richtung Sternum und durch Querschnitte unterhalb der Rippenbögen komplett eröffnet. Die Aorta abdominalis wurde freipräpariert und mit einem Heparin benetzten Butterfly punktiert. Das Blut wurde wiederum in einem Reagenzglas aufgefangen. Nun wurde die Blutprobe für 10 min bei 3000rpm und 15°C zentrifugiert (Heraeus Sepatech Megafuge 1.0 R, Heraeus

Instruments, Osterode), um Serum von Blutzellen zu trennen. Das Serum wurde schließlich abpipettiert und ebenso wie die Urinprobe bis zur späteren Auswertung bei -20°C aufbewahrt.

Als letzter Schritt folgte die Organentnahme, bei der beide Nieren entfernt wurden. Nachdem makroskopisch Nierenkortex von Nierenmark und -becken getrennt wurde, folgte die Schockfrierung in flüssigem Stickstoff, um die Organteile dann bei -80°C aufbewahren zu können.

## **2.4 Gruppeneinteilung der Versuchstiere**

Es erfolgte eine Einteilung der Tiere in 5 Gruppen.

*Kontrolle:* Zur Bestimmung der Referenzwerte dienten diese Tiere als Kontrollgruppe. Bis auf die Clearancemessung, Probengewinnung und Organentnahme wurde keine Intervention durchgeführt.

*Clamp:* Die Operation erfolgte wie unter 2.2 Induktion des ANV beschrieben.

*Clamp-Indo:* Der Eingriff erfolgte simultan zu dem der Clamp Tiere, jedoch wurde die intraoperative Flüssigkeitssubstitution mit NaCl-Lösung (0,9%) gegen Ende der Ischämiezeit durch die intraperitoneale Gabe von Indometacin 1mg/kg KG ersetzt. Diese Injektion von Indometacin noch vor dem Öffnen der beiden Gefäßklemmen auf den Nierenarterien gewährleistete, dass die Substanz systemisch anfluten konnte und bei Entfernen der Gefäßklemmen, also mit der anlaufenden Durchblutung, direkt in die Niere transportiert wurde. Der Ansatz einer „Vortherapie“ sollte hiermit nicht bezweckt werden.

*Sham:* Die Operation erfolgte wie unter 2.2 Induktion des ANV beschrieben, jedoch wurden keine Gefäßklemmen auf die Arteriae renales gesetzt.

*Sham-Indo:* Bei diesen scheinoperierten Tieren wurde ebenfalls keine Gefäßabklemmung durchgeführt. Auch hier wurde die intraoperative Flüssigkeitssubstitution mit NaCl-Lösung 0,9% gegen Ende der Ischämiezeit durch die intraperitoneale Gabe von Indometacin 1mg/kg KG ersetzt.

Die Einteilung der Versuchstiere in die fünf verschiedenen Gruppen erfolgte nach dem Zufallsprinzip.

## 2.5 Bestimmung der glomerulären Filtrationsrate

Die glomeruläre Filtrationsrate (GFR) definiert sich als das Flüssigkeitsvolumen, das von allen Glomeruli pro Zeiteinheit filtriert wird. Als wichtige Größe für die Beurteilung der Nierenfunktion kann sie mithilfe der Inulin Clearance bestimmt werden. Inulin, ein disperses Polymer der Fruktose mit einem Molekulargewicht von 5 kD, eignet sich besonders als Indikatorsubstanz, da es die Nierenfunktion nicht beeinträchtigt, frei filtriert wird, im Tubulussystem weder resorbiert noch sezerniert und in der Niere nicht metabolisiert wird.

Die GFR kann wie folgt berechnet werden:

$$GFR = \frac{V * U(\text{Inulin})}{S(\text{Inulin}) * t} \text{ [ml/min]}$$

V = Harnvolumen [ml]

U (Inulin) = Konzentration von Inulin im Urin [ $\mu\text{g/ml}$ ]

S (Inulin) = Konzentration von Inulin im Serum [ $\mu\text{g/ml}$ ]

t = Zeit [min]

Um die Inulinkonzentrationen in Urin und Serum zu messen, wurde jede Probe mit einem Messpuffer 1:500 verdünnt. Der Puffer bestand aus 1,15g TES (N-tris(hydroxymethyl)methyl-2-aminoethanesulfonsäure) und 1,00g MES (2-(n-norpholino)ethanesulfonsäure), welches in 1l destilliertem Wasser gelöst und mit 1N NaOH auf pH 7,4 gepuffert wurde. Da das Inulin an einen fluoreszierenden Stoff gekoppelt war, konnte die entsprechende Fluoreszenzintensität der Probe an einem Photometer (VICTOR<sup>2</sup> 1420 multilabel counter, Wallace, USA) bei einer Anregungswellenlänge von 480nm

und einer Emissionswellenlänge von 520nm gemessen werden. Die Emission ist dabei direkt proportional zur Inulinkonzentration und somit konnte man mittels einer Standardreihe die entsprechenden Inulinkonzentrationen in den Proben errechnen.

## 2.6 Bestimmung des renalen Plasmaflusses

P-Aminohippurat (PAH) wird von der Niere frei filtriert und transzellulär in den Tubulusurin sezerniert, sodass der Stoff bei einer Nierenpassage fast vollständig ausgeschieden wird. Somit kann die PAH Clearance in etwa dem renalen Plasmafluss (RPF) gleichgesetzt werden und wird nach folgender Formel errechnet:

$$RPF = \frac{V * U(PAH)}{S(PAH) * t} [ml/min]$$

V = Harnvolumen [ml]

U (PAH) = Konzentration von PAH im Urin [ $\mu$ g/ml]

S (PAH) = Konzentration von PAH im Serum [ $\mu$ g/ml]

t = Zeit [min]

Die PAH Konzentrationen in den Proben wurden nach modifizierter Anthron-Methode photometrisch bestimmt. Hierzu wurden die Urin- und Serumproben zunächst mit Perchlorsäure (0,33M) entproteinisiert. Darauf folgte die schrittweise Zugabe von Natriumnitrit-Lösung (1 mg/ml), Ammonium-amidosulfonat-Lösung (5mg/ml) und HCl-Lösung (32%). Die Kupplungsreaktion, bei der die farblose PAH Lösung mit dem Kupplungsreagenz N-(1-Naphthyl)ethylendiaminodihydrochlorid (5mg/ml) zu einem violetten Farbkomplex reagierte, folgte im nächsten Schritt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von Ethanol abs. nach 10 Minuten gestoppt. Die Extinktion des

Farbkomplexes konnte schließlich im Photometer (MRX Dynatech Deutschland GmbH, Deulendorf, Germany) bei einer Wellenlänge von 550nm bestimmt werden. Die Intensität der Farbreaktion ist wiederum direkt proportional zur PAH Konzentration und somit konnte man mittels einer Standardreihe die entsprechenden PAH Konzentrationen in den Proben errechnen.

## 2.7 Berechnung der PAH Nettosekretion

Den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt bei der Sekretion von organischen Anionen stellt der Transport der Anionen vom Blut in die proximale Tubuluszelle dar. Dieser Vorgang wird maßgeblich durch OAT-1 und OAT-3 moduliert. Auch die Substanz PAH gelangt, wie bereits dargestellt, zum Teil auf diesem Weg in den Tubulusurin. Um die möglichst genaue Konzentration des exklusiv im proximalen Tubulus sezernierten Anteils von PAH zu bestimmen, wurde die PAH Nettosekretion berechnet. Dabei wird der im Glomerulus frei filtrierte Anteil der PAH Clearance durch Subtraktion des Anteils aus der Inulin Clearance berechnet und so die tubuläre PAH Nettosekretion (PNS) näherungsweise bestimmt:

$$PNS = (U(PAH) * HZV) - (S(PAH) * GFR) \text{ } [\mu\text{g}/\text{min}]$$

HZV = Harnzeitvolumen [ml/min]

U (PAH) = Konzentration von PAH im Urin [ $\mu\text{g}/\text{ml}$ ]

S (PAH) = Konzentration von PAH im Serum [ $\mu\text{g}/\text{ml}$ ]

GFR = glomeruläre Filtrationsrate [ml/min]



## 2.8 Real-time PCR

Um die mRNA Menge von OAT-1 und OAT-3 im Nierenkortex zu bestimmen, wurde das schockgefrorene Nierengewebe einer RNA Analyse mittels PCR unterzogen. Die RNA wurde mit Hilfe des „Qiagen RNA Isolation Kits“ (Qiagen, Hilden, Deutschland) extrahiert. Nachdem die RNA Konzentration bestimmt worden war, wurde die cDNA mittels des „iScript cDNA synthesis kit“ (Biorad, CA, USA) entsprechend der mitgelieferten Anleitung bestimmt. So wurde die real-time PCR (rt-PCR) entsprechend dem „iQ SYBR-Green Supermix rt-PCR system protocol“ (Biorad, CA, USA) durchgeführt. Zuerst wurden die Proben bei 95°C für drei Minuten denaturiert, gefolgt von 45 Zyklen der PCR-Amplifikation: 15s bei 94°C, dann 30s bei 55°C und schließlich 60s bei 72°C. Der finale Elongationsschritt erfolgte dann für 10 Minuten bei 72°C.

Die Primer für OAT-1 waren 5'-AGA GTC ACA GAG CCC TGC AT-3' (sense) und 5'-GCC CAG GCT GTA GAC ATA GC-3' (antisense), woraus ein rt-PCR-Produkt bestehend aus 402 Basenpaaren (bp) resultierte. Die Primer für OAT-3 waren 5'-TCC TGG TGG GTA CCA GAG TC-3' (sense) und 5'-CTG CAT TTC TGA AGG CAC AA-3' (antisense), was in einem rt-PCR-Produkt bestehend aus 468 bp resultierte. Für  $\beta$ -Aktin waren die Primer 5'-TCT ACA ATG AGC TGC GTT TG-3' (sense) und 5'-TAC ATG GCT GGG GTG TTG AA-3' (antisense), was in einem rt-PCR-Produkt bestehend aus 129 bp resultierte.

Sämtliche PCR-Produkte wurden mittels einer Agarosegel-Elektrophorese und einer Schmelzpunkt Analyse auf ihre korrekte Größe getestet. Die quantitative Bestimmung wurde über die  $\Delta\Delta C_T$  - Methode durchgeführt, die  $\beta$ -Aktin als Referenz verwendet. Die Expression in den Kontrollproben wurde gleich 1 gesetzt.

## **2.9 Western Blot Verfahren**

### **2.9.1 Aufarbeitung der Proben**

Es wurden Teile der bei -80°C gelagerten Proben aus dem Nierenkortex zur Aufarbeitung entnommen. Nach Zerkleinerung wurden die Proben mit einem Lysispuffer, bestehend aus 25 mmol/l Tris-HCl (pH 7,0), 7mmol/l reduziertem Glutathion, 0,5 mmol/l EDTA (pH 8,0), 0,2 mmol/l Phenylmethylsulfonylfluorid, 1 µmol/l Leupeptin, 1µmol/l Pepstatin, 1µmol/l Trans-Epoxy succinyl-L-Leucylamiddobutan und 1mg/ml Trypsininhibitor, versetzt und mit einem Ultra-Turrax-Homogenisierer T8 (Ika Labortechnik, Staufen, Deutschland) homogenisiert. Anschließend wurde der Proteingehalt der Proben mit Hilfe des Bradford-Assays bestimmt.<sup>118</sup> Die Proben wurden entsprechend dem Proteingehalt mit Probenpuffer (200 mmol/l Tris-Puffer, SDS 6%, Glycerol 15% und Bromthymolblau) versetzt und für 5 Minuten bei 95°C denaturiert. Anschließend wurden die Proben portioniert und bei -20°C tiefgefroren.

### **2.9.2 Western Blot Analyse**

Nach dem Auftauen und Zentrifugieren wurden die Proteinlysate bei einem Proteingehalt von 30µg auf ein 5%iges Sammelgel (500µl TrisHCl [pH 6,8], 250µl Acylamid/Bisacrylamid 40%, 1250µl dd H<sub>2</sub>O, 18µl SDS 10%, 7,5µl APS 10% und 2,5µl TEMED) aufgetragen.

Die Auftrennung erfolgte über ein 10%iges Trenngel (1000µl TrisHCl [pH 8,8], 1000µl Acylamid/Bisacrylamid 40%, 2000µl dd H<sub>2</sub>O, 45µl SDS 10%, 15µl APS 10% und 5µl TEMED) bei 125 Volt und 80mA über zwei Stunden. Der verwendete Laufpuffer bestand aus 15,1g Tris Base, 94g Glycin und 50ml SDS 10% auf 1000ml H<sub>2</sub>O.

In einem mit Blottingpuffer (5,8 g Tris Base, 94g Glycin und 0,38g SDS 10% auf 1000ml H<sub>2</sub>O) gefüllten Tankblot (Fa. Biorad) wurde das Protein vom Gel auf eine Nitrocellulose-Membran (Amersham Pharmacia Biotech, England) übertragen. Um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren, wurde die

Membran für eine Stunde bei Raumtemperatur mit Blotto-Lösung (3%iges fettfreies Milchpulver in Tris-Puffer-Lösung-TBS [20 mmol/l Tris, 150 mmol/l NaCl, pH 7,5] und 0,1% Tween [Tween 20 pure, Serva, Deutschland]) versetzt.

Im nächsten Schritt wurden nach dreimaligen, je fünf-minütigem Waschen mit Waschpuffer (TBS-Tween-Puffer: 20 mmol/l Trisbase, 137 mmol/l NaCl, Tween 20 0,05%) die entsprechenden Antikörper (Tab. 1) in den genannten Konzentrationen zu der Membran in die Blotto-Lösung gegeben und über Nacht bei 4°C inkubiert.

<b>AK</b>	<b>Firma</b>	<b>Molekulargewicht</b>	<b>Konzentration</b>	<b>2. AK</b>	<b>Konzentration</b>
OAT-1	Biotrend	57 kDa	1:500	Rabbit-IgG, DAKO	1:2000
OAT-3	Biotrend	110 kDa	1:500	Rabbit-IgG, DAKO	1:2000
β-Aktin	Sigma	44 kDa	1: 50.000	Mouse-IgG, DAKO	1 : 10.000

Tab. 1: Verwendete Antikörper im Western Blot

Nun erfolgte ein dreimaliger Waschvorgang mit dem Waschpuffer. Der zweite Antikörper, der mit Horseradish-Peroxidase konjugiert und gegen den ersten Antikörper gerichtet war, wurde dann in entsprechender Konzentration in der Blotto-Lösung für 45 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Wieder folgte ein dreimaliger Waschvorgang mit dem Waschpuffer.

Daraufhin wurden die Detektionsreagenzien I und II (ECL, Amersham Pharmacia Biotech, England) in gleichen Mengen zusammengemischt und auf

die mit der Proteinseite nach oben liegenden Membran pipettiert. Nach fünf Minuten wurde überschüssiges Reagenz wieder entfernt und im lichtgeschützten Raum ein High-Performance-Chemiluminescence-Film (Fuji, Japan) auf die Membran gelegt. Die Analyse des entwickelten Films durch densitometrische Bestimmung erfolgte mit der Quantity One-Software von BIO RAD Laboratories (Philadelphia, USA).

## **2.10 Statistik**

Zur Signifikanzbestimmung wurde der T-Test nach Student für zufällig gebildete Gruppen verwendet. Dabei werden die Mittelwerte von zwei unabhängigen normalverteilten Stichproben, die die gleiche Streuung haben, verglichen. Die Berechnung erfolgte mittels Microsoft Excel 2007 (Microsoft Corporation, Germany). Die statistische Varianzanalyse erfolgte mit dem ANOVA Test in der univariante Bestimmung (Sigma Stat 3.5, Systat Software AG, Erkrath).

Das Signifikanzniveau wurde nach den allgemein üblichen Grenzen festgelegt:  $p < 0,05$  = signifikant und  $p \geq 0,05$  = nicht signifikant.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Expression von OAT-1 und OAT-3 nach ischämisch bedingtem akuten Nierenversagen

In vorrausgehenden Studien konnte gezeigt werden, dass Prostaglandin E<sub>2</sub> vermehrt im akuten Nierenversagen gebildet wird und zu einer Herunterregulation von OAT-1 und OAT-3 in den proximalen Tubuluszellen der Niere führt.<sup>88,112,115</sup> Daraus entwickelte sich die Arbeitshypothese, dass man durch die nicht-selektive Hemmung der Cyclooxygenasen mittels Indometacin die Bildung von Prostaglandin E<sub>2</sub> hemmen und somit die Herunterregulation der OAT-1 und OAT-3 aufheben könnte.

Um die Expression der OAT-1 und OAT-3 nach iANV zu analysieren, wurde zum einen die mRNA Menge der OATs in einem Lysat des tiefen Nierenkortexgewebes 24h nach Ischämie mittels rt-PCR bestimmt, zum anderen wurde die Proteinmenge der OAT in dem Lysat des tiefen Nierenkortexgewebes 24h nach Ischämie durch Western Blot Verfahren gemessen. Somit konnten die beiden wichtigsten Teilschritte der Expression der OATs verfolgt werden. Die mRNA stellt das Verbindungsstück zwischen Zellkern und Ribosom dar und die Proteinmenge gibt an, wie viel OAT Protein tatsächlich gebildet wurde.

Betrachtet man nun die mRNA Mengen sowohl der OAT-1 als auch der OAT-3, bestätigen sich zunächst die Ergebnisse der Studie von Schneider et al. 2007 (Abb. 5 und 6). Im iANV findet eine Herunterregulation der genannten Transporter statt, denn in der Clamp Gruppe nimmt die mRNA Menge der OAT-1 um 87,5% und der OAT-3 um 80,3% im Vergleich zur Sham Gruppe ab. Weiterhin wird deutlich, dass 1mg/kg Indometacin in den scheinoperierten Tieren (Sham-Indo Gruppe) allein keinen Effekt auf die mRNA Menge im proximalen Tubulus hat. Eine durch das iANV induzierte Abnahme der mRNA Menge sowohl von OAT-1 und OAT-3 wurde hingegen durch die Gabe von 1mg/kg Indometacin vollständig aufgehoben.

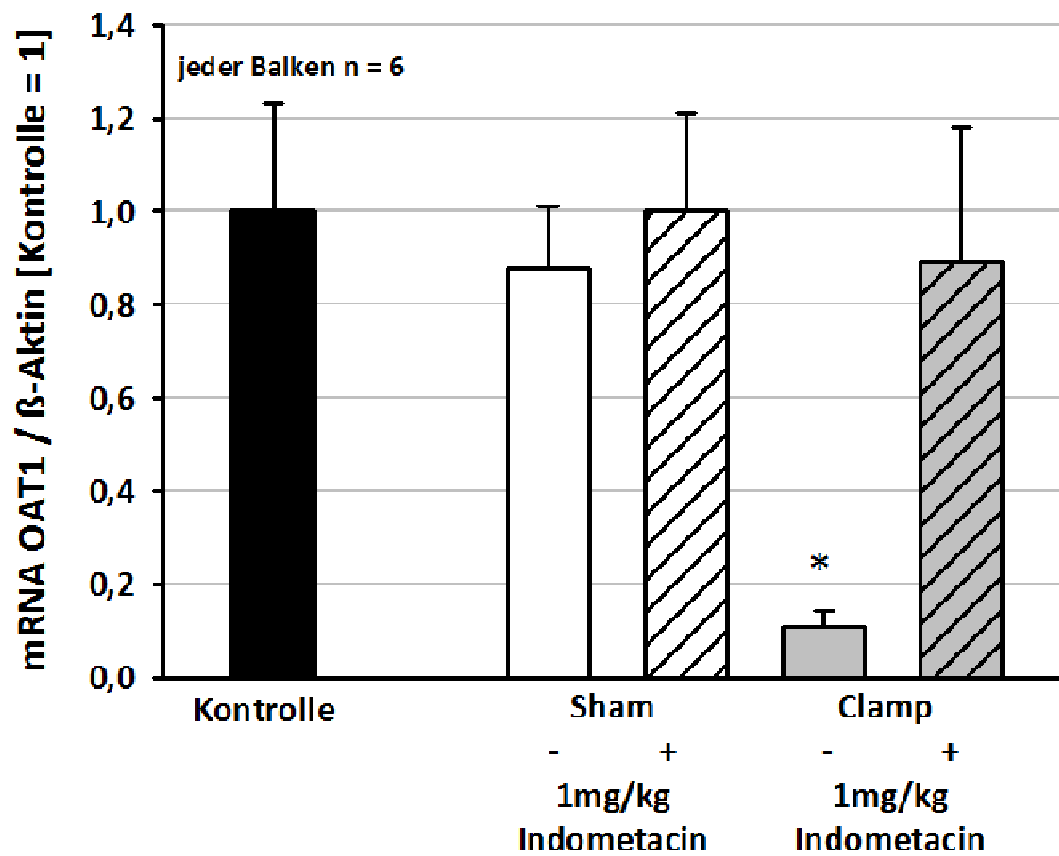


Abb. 5: OAT-1 mRNA nach ischämisch bedingtem akuten Nierenversagen und Gabe von 1mg/kg Indometacin. \* Statistisch signifikanter Unterschied zwischen Sham- und Clamp Gruppe ( $p < 0,05$ ).

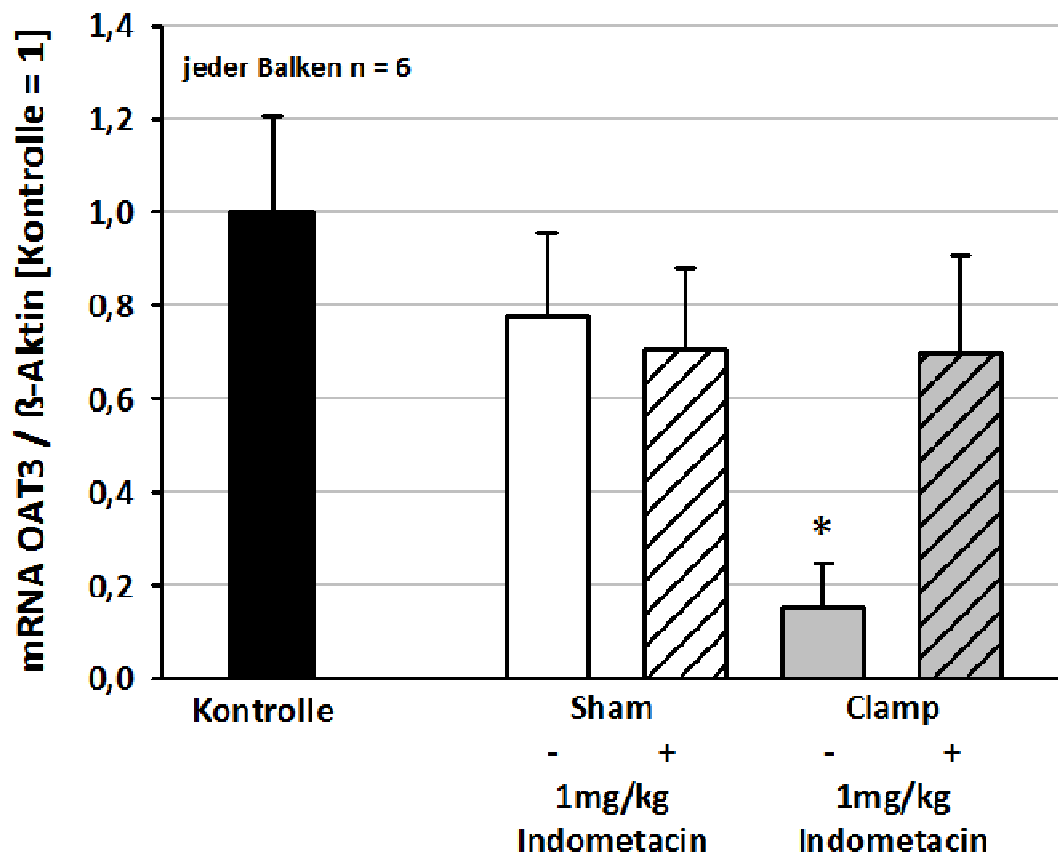


Abb. 6: OAT-3 mRNA nach ischämisch bedingtem akutem Nierenversagen und Gabe von 1mg/kg Indometacin. \* Statistisch signifikanter Unterschied zwischen Sham- und Clamp Gruppe ( $p < 0,05$ ).

Ähnlich deutliche Ergebnisse zeigten sich auf Proteinebene im Western Blot. Wieder bestätigt sich, dass beide OAT im iANV herunter reguliert werden (Abb. 7 und 8). Die Proteinmenge in der Clamp Gruppe ist im Vergleich zur Sham Gruppe hinsichtlich der OAT-1 um 58% und bezogen auf die OAT-3 um 51% herabgesetzt. Indometacin hat ebenfalls in den Sham Tieren keinen signifikanten Effekt auf die Proteinmenge. Hervorzuheben ist aber, dass 1mg/kg Indometacin bei den Tieren mit iANV keine Herunterregulation der OAT Proteinexpression im Lysat des tiefen Nierenkortexgewebes bewirkt. Dies gilt sowohl für die OAT-1 als auch für die OAT-3.

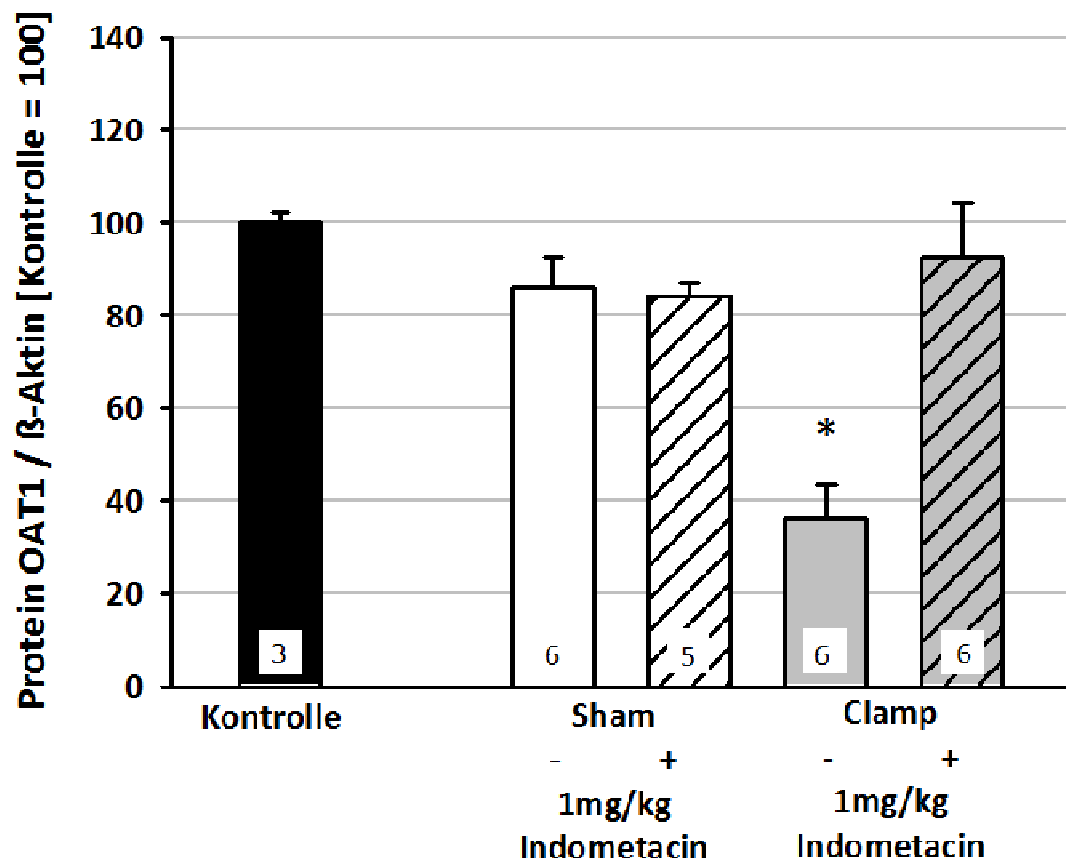


Abb. 7: OAT-1 Protein nach ischämisch bedingtem akuten Nierenversagen und Gabe von 1mg/kg Indometacin. \* Statistisch signifikanter Unterschied zwischen Sham- und Clamp Gruppe ( $p < 0,05$ ).



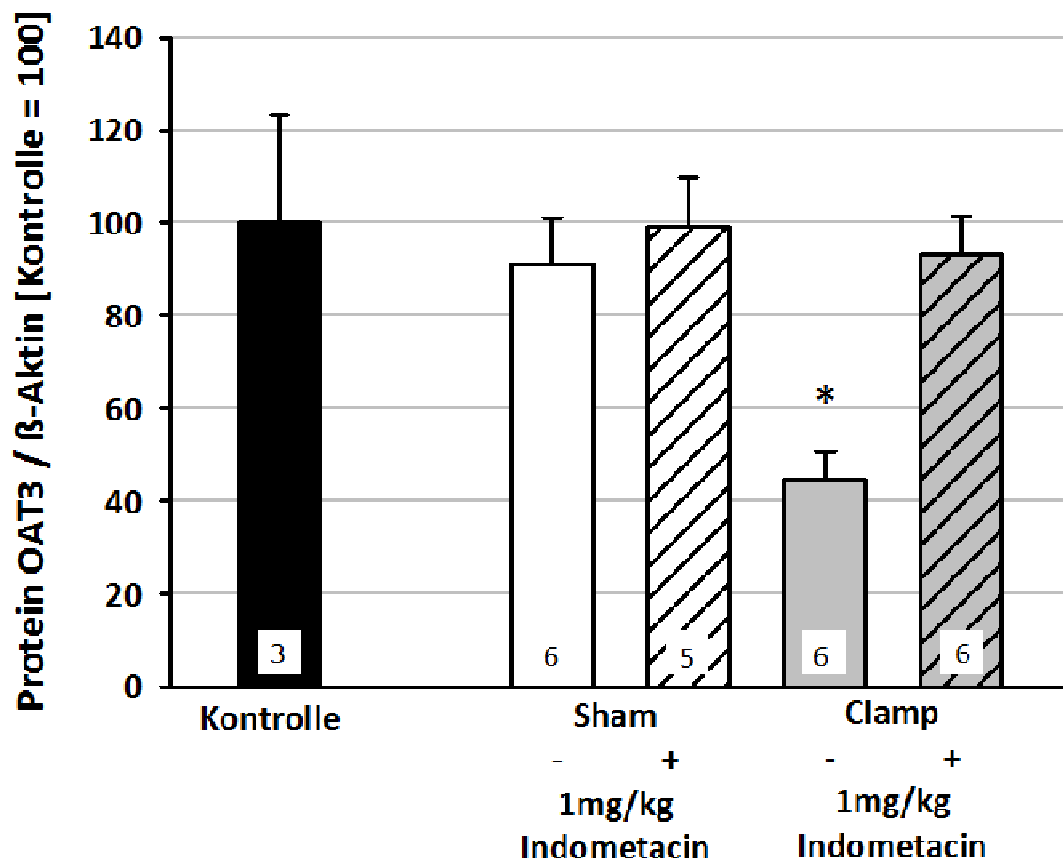


Abb. 8: OAT-3 Protein nach ischämisch bedingtem akuten Nierenversagen und Gabe von 1mg/kg Indometacin. \* Statistisch signifikanter Unterschied zwischen Sham- und Clamp Gruppe ( $p < 0,05$ ).

*Es lässt sich somit zusammenfassen, dass Indometacin die Herunterregulation von OAT-1 und OAT-3 im iANV aufhebt. Dies bestätigt sich sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene. Diese Ergebnisse der Expression lassen jedoch noch keine Rückschlüsse auf die Funktion der Transporter schließen. Da trotz wieder normalisierter Expression die regelrechte Funktion der OAT durch funktionell relevante Mechanismen gestört sein könnte, wurde die PAH Nettosekretion als Indikator der Funktion von OAT-1 und OAT-3 bestimmt.*

### **3.2 PAH Nettosekretion nach ischämisch bedingtem akuten Nierenversagen**

Der Transport von organischen Anionen über OAT-1 und OAT-3 stellt den wesentlichen und geschwindigkeitsbestimmenden Schritt bei der Exkretion der organischen Anionen in den proximalen Tubuluszellen der Niere dar. Um die Funktion der OAT in dieser Versuchsreihe zu beschreiben, wurde die Testsubstanz PAH, als prototypisches Substrat der OAT, eingesetzt und so die PAH Nettosekretion (PNS) bestimmt.<sup>119</sup> Die PNS zeigt die reine PAH Sekretionsleistung der Niere an und ist damit ein indirekter Marker für die tubuläre Exkretionsfunktion und somit für die allgemeine Funktionsfähigkeit des proximalen Tubulus.

Wie in Abbildung 9 dargestellt führte das iANV in unbehandelten Tieren zu einer Abnahme der PNS um rund 43,7% (vgl. Sham vs. Clamp). Bereits bei den scheinoperierten Tieren bewirkte Indometacin einen Anstieg der PNS auf das 1,49fache verglichen zu den unbehandelten Sham Tieren. In den Ischämie-Tieren führte Indometacin sogar zu einer 1,97fachen Erhöhung der PAH Nettosekretion (vgl. Clamp-Indo vs. Clamp) und somit erreichten Clamp-Indo Tiere unter Indometacintherapie wieder die Werte der Kontroll- und unbehandelten Sham Gruppe, allerdings nicht die der adäquaten Kontrolle (Sham-Indo).

Da die Funktionsverbesserung der Indometacin behandelten Sham Gruppe nicht auf einer vermehrten OAT-Expression basiert, könnte dies ein Hinweis auf einen noch zusätzlichen, OAT-1 und OAT-3 expressionsunabhängigen Mechanismus sein, den man mit den durchgeführten Versuchen jedoch nicht genauer erklären kann.

Summierend kann man anhand der vorliegenden Daten nachweisen, dass die OAT-Expression gut mit den funktionellen Daten der Sekretion im iANV korreliert.

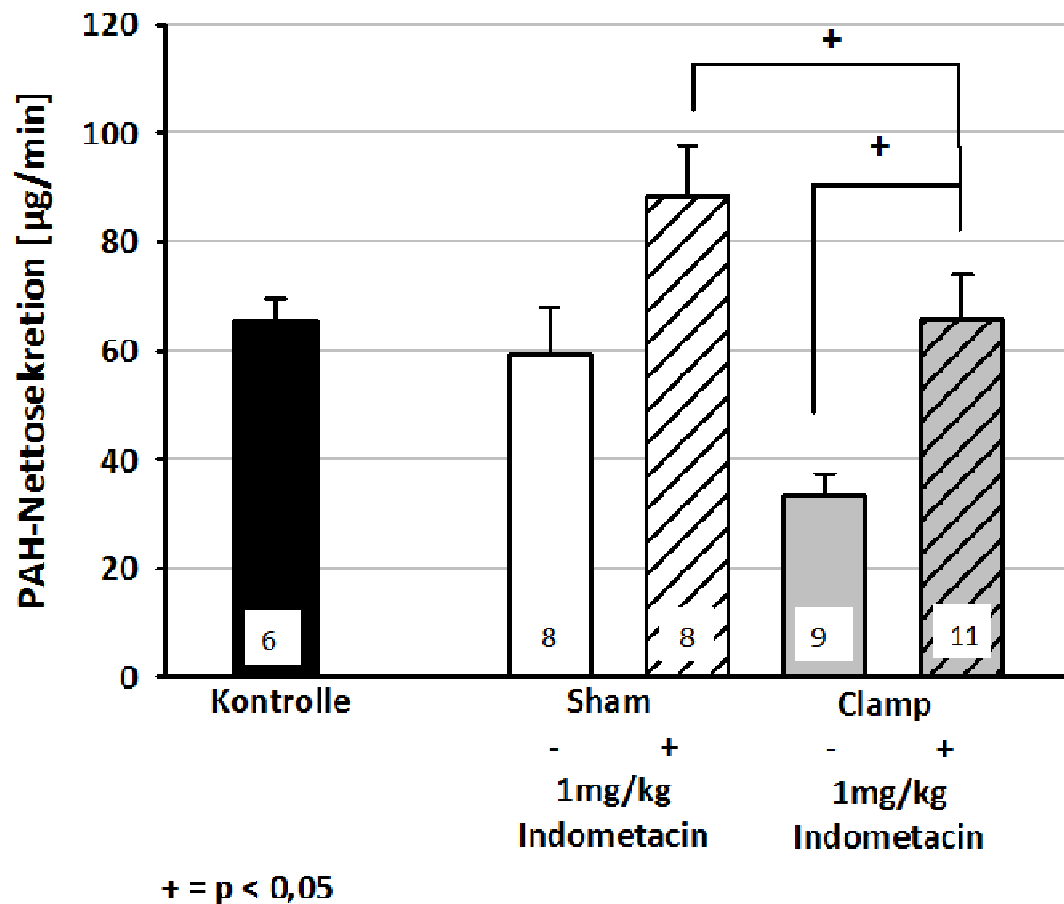


Abb. 9: PAH Nettosekretion nach ischämisch bedingtem akutem Nierenversagen und Gabe von 1mg/kg Indometacin

*Es konnte gezeigt werden, dass Indometacin nicht nur die Herunterregulation der OAT aufhebt, sondern auch die Funktion der Transporter wieder herstellt. Diese Daten beziehen sich jedoch nur auf den proximalen Tubulus der Niere und bieten keinen globalen Blick auf die Nierenfunktion. Deshalb wurden im weiteren Verlauf der Untersuchung die glomeruläre Filtrationsrate, als Goldstandard der Nierenfunktionsmessung, und der renale Plasmafluss bestimmt.*

### **3.3 Nierenfunktionsparameter RPF und GFR nach ischämisch bedingtem akuten Nierenversagen**

Der Einsatz von Indometacin im ANV wurde bisher aufgrund des bekannten Nebenwirkungsprofils der NSAR bei Vorliegen einer renalen Funktionseinschränkung im klinischen Einsatz abgelehnt und bislang gibt es auch nur sehr wenige Studien, die einen positiven Effekt von Indometacin im ANV zeigen.<sup>117</sup> Umso bedeutender sind die nachfolgenden Ergebnisse, die mit der Therapie von sehr niedrig dosiertem Indometacin (1mg/kg) im iANV erhoben wurden.

Bereits beim renalen Plasmafluss, der mit Hilfe der PAH Clearance bestimmt wurde, zeigt sich eine protektive Wirkung von Indometacin (Abb. 10). Bei den Ischämie-Tieren ohne Therapie kam es zu einem massiven Abfall der PAH Clearance auf  $0,88 \pm 0,13$  ml/min im Vergleich zu den Sham Tieren, deren Clearance  $4,31 \pm 0,42$  ml/min betrug. Ischämie-Tiere, die mit Indometacin behandelt wurden, zeigten eine Verdopplung der PAH Clearance mit Werten von  $1,82 \pm 0,36$  ml/min im Vergleich zur Clamp Gruppe ohne Therapie. Werte der Sham Gruppe wurden hierbei nicht erreicht. Indometacin allein hatte keine Auswirkung, denn Sham-Indo Tiere wiesen eine PAH Clearance von  $4,77 \pm 0,13$  ml/min und unterschieden sich somit nicht signifikant von den Sham Tieren.

Da die PAH Clearance sowohl von der renalen Perfusion als auch von der PAH Sekretion in den proximalen Tubuluszellen abhängig ist, könnte dieser Effekt möglicherweise auch nur durch die verbesserte PAH Sekretion allein entstehen. Somit lässt sich nicht genau feststellen, ob und in welchem Ausmaß die renale Durchblutung durch Indometacin wirklich verbessert wird.

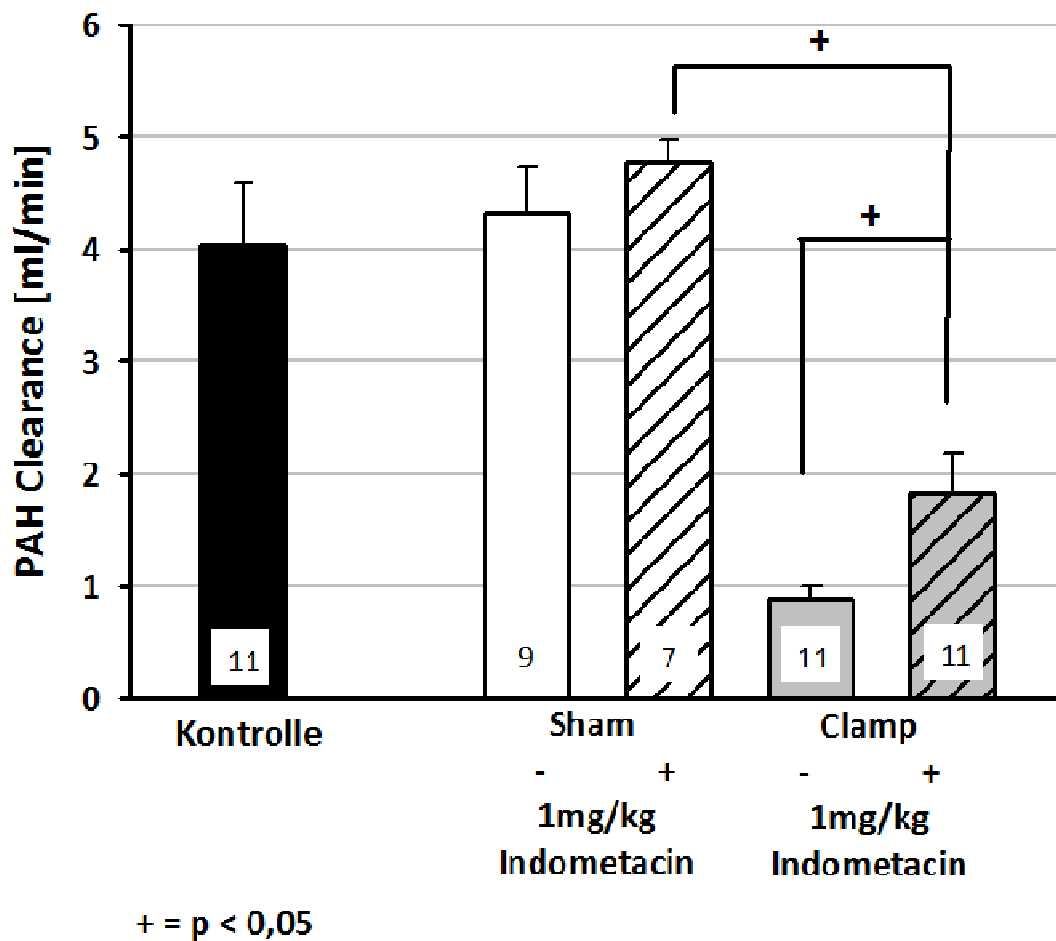


Abb. 10: Renaler Plasmafluss nach ischämisch bedingtem akuten Nierenversagen und Gabe von 1mg/kg Indometacin

Aus den Ergebnissen der glomerulären Filtrationsrate abgeleitet setzen sich die Hinweise auf eine positive Wirkung von 1mg/kg Indometacin im iANV nahtlos fort (Abb. 11). Wieder kommt es zu einem massiven Absinken der Inulin Clearance der Clamp Gruppe ( $0,19 \pm 0,02$  ml/min) im Vergleich zu der Sham Gruppe ( $0,57 \pm 0,04$  ml/min), welches durch Gabe von 1mg/kg Indometacin zu einem großen Teil aufgehoben werden kann, denn die Clamp-Indo Tiere wiesen Clearance Werte von  $0,43 \pm 0,10$  ml/min auf. Die GFR der Clamp-Indo Tiere ist zwar niedriger als die GFR der Sham-Indo Tiere, unterscheidet sich aber nicht mehr statistisch signifikant von der Kontroll- oder Sham Gruppe. Es besteht

weiterhin ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen Clamp und Clamp-Indo Gruppe.

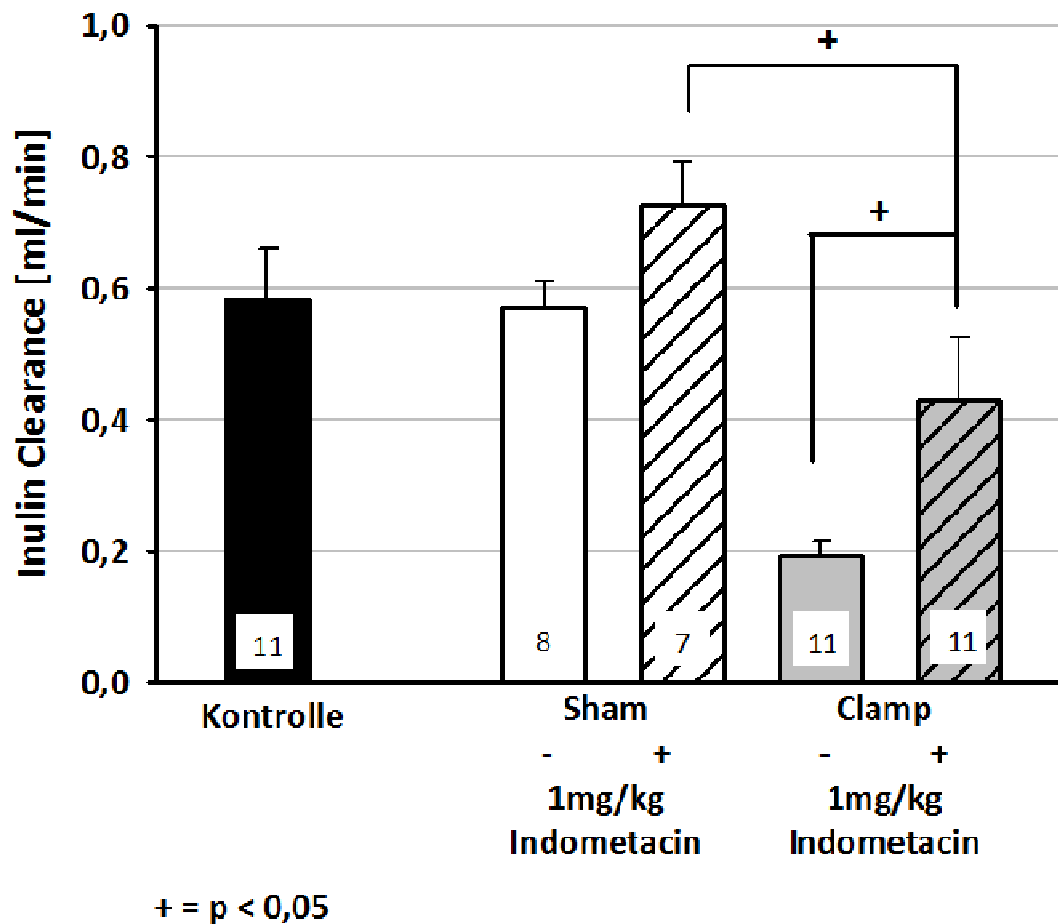


Abb. 11: Glomeruläre Filtrationsrate nach ischämisch bedingtem akuten Nierenversagen und Gabe von 1mg/kg Indometacin

Zusammenfassend lässt sich also sagen, dass niedrig dosiertes Indometacin (1mg/kg) nicht nur einen positiven Effekt auf die OAT-Expression und -Funktion hat, sondern auch die gesamte Nierenfunktion, gemessen an der PAH- und Inulin-clearance, verbessert.

## **4 Diskussion**

### **4.1 Allgemeines**

In dieser Arbeit stellte sich basierend auf den Voruntersuchungen von Schneider et al. 2007 und Sauvant et al. 2006 die Frage, ob die verminderte Expression von OAT-1 und OAT-3 nach ischämisch bedingtem akuten Nierenversagen auf einer Herunterregulation durch Prostaglandin E<sub>2</sub> beruht. Wenn dies der Fall wäre, sollte eine Hemmung bzw. Minderung der vermehrten Bildung von kortikalem Prostaglandin E<sub>2</sub> im iANV die Herunterregulation von OAT-1 und OAT-3 aufheben oder zumindest reduzieren. Deshalb wurden die Effekte des nicht-selektiven COX-Inhibitors Indometacin auf die Expression der genannten Transporter, auf den Transport von organischen Anionen, sowie auf die gesamte Nierenfunktion untersucht.

### **4.2 Methodik**

Das verwendete Tiermodell eines ischämisch bedingten akuten Nierenversagens ist ein etabliertes und standardisiertes Verfahren, das bereits in früheren Arbeiten der Arbeitsgruppe Schneider et al. verwendet wurde.<sup>112,120,121</sup> Die komplexen Messverfahren der Inulin- und PAH Clearance, sowie der real-time PCR und dem Western Blot Verfahren entsprechen ebenfalls einem standardisierten Protokoll, wodurch eine gute Reproduzierbarkeit mit hinreichender Genauigkeit gewährleistet ist.

Weiterhin können Einflüsse durch personenbedingte Unterschiede im Operationsverfahren ausgeschlossen werden, da alle Operationen durch einen Untersucher ausgeführt wurden. Da es sich jedoch um ein in-vivo Modell handelt, sind individuelle tierbedingte Einflüsse nicht ganz auszuschließen, weshalb eine entsprechende Fallzahl (n = 54) zum Erreichen einer geeigneten Fallzahl gewählt wurde.

Untersuchungen zur zeitlichen Abfolge der Expression der organischen Anionentransporter und der Nierenfunktion nach renaler Ischämie zeigten ein Maximum der Schädigung zwischen 6h und 24h nach Ischämie.<sup>112</sup> Deshalb konzentrierten sich die Untersuchungen dieser Arbeit auf ein Reperusionsintervall von 24h. Der Effekt der renalen Ischämie, der nach 24h Reperfusion beobachtet werden konnte, ist gut mit den Voruntersuchungen von Schneider et al. 2007 vereinbar, was wiederum für eine gute Reliabilität und Reproduzierbarkeit dieses in-vivo Modells des ischämisch bedingten akuten Nierenversagens spricht.

### **4.3 Expression und Funktion der OAT-1 und OAT-3**

Viele Jahre ging man davon aus, dass die renale Sekretion organischer Anionen im proximalen Tubulus ständig auf dem gleich hohen Niveau verläuft und keiner raschen Regulation unterliegen würde.<sup>102,103,122</sup> Wie bereits erwähnt, gibt es jedoch immer mehr Belege dafür, dass der Transport organischer Anionen reguliert wird. Auch die Ergebnisse dieser Arbeit machen deutlich, dass die organischen Anionentransporter einer Regulation unterliegen: OAT-1 und OAT-3 werden im iANV herunter reguliert und Indometacin verhindert diese Ischämie bedingte Herunterregulation. Sowohl die mRNA-, als auch die Proteinmengen von OAT-1 und OAT-3 aus der Clamp-Indo Gruppe unterscheiden sich nicht zu denen der Sham Gruppen, wohingegen die Clamp Gruppe eine deutliche Abnahme der mRNA- und Proteinmengen zeigt. Dies unterstützt die Arbeitshypothese, dass Prostaglandin E<sub>2</sub>, welches im ischämisch bedingten akuten Nierenversagen vermehrt gebildet wird, die Herunterregulation von OAT-1 und OAT-3 bedingt.

Entscheidender als die Expression von OAT-1 und OAT-3 ist jedoch deren Funktion. Auch hier sollte Indometacin einen positiven Effekt zeigen. So wurde die PAH Nettosekretion gemessen. Sie zeigt die reine PAH Sekretionsleistung der Niere an und stellt damit einen indirekten Marker für die tubuläre Exkretionsfunktion dar. PAH sowie PGE<sub>2</sub> gelten als klassische Substrate der



organischen Anionentransporter und da OAT-1 und OAT-3 den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt bei der Sekretion von renalen organischen Anionen vermitteln, kann man so die Funktion der Transporter bestimmen. Auch hier zeigen die Ergebnisse eine deutliche Funktionsverbesserung der Transporter unter Indometacin.

Die Arbeitsgruppe um Höcherl et al. 2009 konnte einen ähnlichen Effekt auf die Expression von OAT-1 und OAT-3 und die organische Anionensekretion 12h nach renaler Ischämie zeigen, wobei hier der COX-2-Inhibitor Parecoxib in einer Konzentration von 20mg/kg KG verwendet wurde.<sup>123</sup> Obwohl es einige Unterschiede zu dieser Arbeit gibt - der COX-2-Inhibitor wurde hochdosiert und bereits 1h vor einer 30-minütigen Ischämie mit 12h Reperfusion gegeben - unterstützen die Daten von Höcherl et al. 2009 die Hypothese, dass Prostaglandin E<sub>2</sub> die Herunterregulation von OAT-1 und OAT-3 nach einer renalen Ischämie vermittelt. Weiterhin beschreiben die Autoren einen Ischämie bedingten Anstieg von Prostaglandin E<sub>2</sub> im Nierenkortex in der Reperfusionsphase, welcher durch Parecoxib vermindert wurde. Zusammen mit der Tatsache, dass Prostaglandin E<sub>2</sub> zu einer Herunterregulation von OAT-1 und OAT-3 in der Zellkultur aus proximalen Tubuluszellen der Ratte (NRK-52E) führt, sind diese Ergebnisse ein starker Hinweis dafür, dass Prostaglandin E<sub>2</sub> nach Ischämie OAT-1 und OAT-3 auch in vivo herunter reguliert. Trotzdem ist dies streng genommen noch kein echter Beweis, denn auch andere Eicosanoide, die durch die COX gebildet werden, könnten diesen Effekt haben. Weitere Untersuchungen sind nötig, um einen genaueren Einblick in die Regulationsmechanismen zu erhalten.

Abgesehen von seiner möglichen regulatorischen Wirkung auf die Expression von OAT-1 und OAT-3 ist Prostaglandin E<sub>2</sub> weiterhin ein Beispiel für ein endogenes Substrat des renalen organischen Anionentransports.<sup>124</sup> Deshalb untersuchten Schneider und Meusel et al. 2009 zusätzlich die renalen Ausscheidungsmechanismen von Prostaglandin E<sub>2</sub>. Hierbei wurde eine Reduktion der PGE<sub>2</sub> Clearance im ischämisch bedingten akuten Nierenversagen gezeigt, die wiederum durch Indometacin verhindert wurde.<sup>125</sup>

Noch beeindruckender war, dass der Ischämie-Reperfusionsschaden zu einer Reduktion der PGE<sub>2</sub> Sekretion führte, welche ebenfalls durch Indometacin aufgehoben wurde. Daraus lässt sich schließen, dass obwohl Prostaglandin E<sub>2</sub> in der Reperfusion nach Ischämie im Nierenkortex vermehrt gebildet wird<sup>88,89,123</sup>, die Menge an PGE<sub>2</sub>, die in das Tubuluslumen sezerniert wird, herabgesetzt ist. Somit konnte sowohl mit PAH, als exogene Substanz, als auch mit einem Anion endogenen Ursprungs (PGE<sub>2</sub>) gezeigt werden, dass die Sekretion von organischen Anionen in der Reperusionsphase nach Ischämie vermindert ist. Dieser Effekt wird durch Indometacin aufgehoben.

In der aktuellen Forschungsdiskussion zur Pathophysiologie des ischämisch bedingten akuten Nierenversagens geht man davon aus, dass eine verminderte Ausscheidung von toxischen Substanzen (z.B. Urämietoxine) ebenfalls zum renalen Schaden beiträgt.<sup>126</sup> Die Herunterregulation von OAT-1 und OAT-3 durch eine Akkumulation von (anionischen) Stoffwechsellendprodukten könnte hierbei eine wichtige Rolle spielen. Daraus folgt, dass die Aufrechterhaltung der Sekretion organischer Anionen nach einer Ischämie durch Indometacin möglicherweise den Ischämie-Reperfusionsschaden reduzieren könnte. Ob diese theoretische Betrachtung auch in Menschen reproduzierbar ist, muss durch weitere Untersuchungen nachgewiesen werden. Wenn sich diese Annahme jedoch bestätigen würde, könnte sie einen neuen Erklärungsansatz für die Schädigungsmechanismen und deren Vermeidung in der Reperfusion nach akuter Ischämie liefern.

#### **4.4 Nierenfunktion**

Um das renale funktionelle Outcome nach einer akuten Ischämie zu beschreiben, wurden PAH- und Inulin Clearance gemessen. Sie dienen als Parameter für den renalen Plasmafluss (RPF) und für die glomeruläre Filtrationsrate (GFR) und geben somit einen Überblick über die gesamte Nierenfunktion.

Die Ergebnisse der PAH Clearance unterstützen die Hypothese, dass Indometacin einen positiven Effekt im iANV hat. Kam es bei den Ischämie-Tieren ohne Therapie zu einem massiven Abfall der PAH Clearance, konnte dieser durch Indometacin zumindest teilweise wieder verbessert werden. Wie bereits erwähnt, ist es jedoch schwer zu entscheiden, ob und in welchem Ausmaß die renale Perfusion wirklich durch Indometacin verbessert wurde, denn die PAH Gesamtclearance ist sowohl von der renalen Filtration im Glomerulum als auch von der aktiven PAH Sekretion in den proximalen Tubuluszellen abhängig und die dargestellten Ergebnisse zeigen, dass schon die PAH Nettosekretion durch Indometacin positiv beeinflusst wurde.

Da Indometacin zusätzlich auch den Abfall der GFR 24h nach renaler Ischämie signifikant verbessern konnte, deutet dies darauf hin, dass Indometacin nicht nur eine tubuläre Verbesserung der Nierenfunktion nach einem Ischämie-Reperfusionsschaden bewirkt. Es gibt Hinweise dafür, dass die späte (24h nach einer Ischämie) Reduktion der GFR nach iANV zumindest teilweise auf den tubuloglomerulären Feedbackmechanismus (TGF) der Niere zurück zu führen ist.<sup>127</sup> Nach ischämischem Schaden ist die Natriumrückresorption in den proximalen Tubuluszellen vermindert<sup>128</sup>, was dazu führt, dass mehr Natrium im distalen Nephron anfällt und somit ein Signal für den TGF darstellt. Die so bedingte Aktivierung des TGF bewirkt wiederum eine Vasokonstriktion der Vasa afferentia des Glomerulums und somit eine Reduktion der GFR.<sup>129,130</sup> Weiterhin weiß man, dass Produkte aus dem COX-Stoffwechsel den tubuloglomerulären Feedbackmechanismus beeinflussen.<sup>131</sup> Es ist beschrieben, dass Prostaglandin  $F_{2\alpha}$  und Thromboxan  $A_2$  über die Aktivierung des Thromboxan  $A_2$  Rezeptors (TP) den TGF verstärken und somit eine Reduktion der GFR bewirken.<sup>132</sup> Daraus könnte sich ein weiterer Ansatz für die Erklärung des positiven Effekts von Indometacin, als nicht-selektiver COX-Inhibitor, auf die GFR 24h nach Ischämie bilden, obwohl dieser nur spekulativ ist und weiter untersucht werden muss. Zusammenfassend kann man jedoch sagen, dass die PAH Clearance wie auch die Inulin Clearance im iANV positiv durch niedrig dosiertes Indometacin (1mg/kg) beeinflusst wurden.

Aus den Untersuchungen lässt sich folglich schließen, dass der COX-Inhibition eine protektive Rolle zugeschrieben werden kann. Auch die Arbeitsgruppe um Feitoza et al. kam zu einem ähnlichen Ergebnis.<sup>116,117,133</sup> Hier wurde Indometacin sogar noch höher dosiert (5mg/kg KG), aber im Gegensatz zu der Applikationsform dieser Arbeit (nach Ischämie) schon vor der Ischämie gegeben. Das Ergebnis, dass niedrig dosiertes Indometacin (1mg/kg KG), welches nach der Ischämie appliziert wurde, einen positiven Effekt auf das renale Outcome nach einem Ischämie-Reperfusionsschaden hat, stellt somit eine Neuheit dar, die bisher noch von keiner anderen Arbeitsgruppe gezeigt werden konnte. Diese Ergebnisse sind also auch von besonders hohem Interesse, weil sie eine Therapieoption nach einem bereits eingetretenen Nierenversagen untersuchten.

Auch in pharmakologischer Hinsicht sind diese Erkenntnisse von besonderer Bedeutung. Da nun Hinweise dafür bestehen, dass COX-Metaboliten, vor allem Prostaglandin E<sub>2</sub>, in der Reperusionsphase eine entscheidende Rolle bei der Entstehung und der Aufrechterhaltung des renalen Schadens spielen, könnte eine pharmakologische Intervention im ischämisch bedingten akuten Nierenversagen oder nach einer Nierentransplantation zu einer möglichen therapeutischen Option werden. Hierfür wären aber noch zahlreiche weitere Studien notwendig, da Indometacin zu einer Verbesserung der Nierenfunktion führte, die damit verbundene Reduktion des Nierenschadens aber bisher noch nicht histomorphologisch dargestellt wurde.

#### **4.5 Inflammation**

Es ist allgemein akzeptiert, dass Entzündungsprozesse eine bedeutende Rolle in der Pathophysiologie des ischämisch bedingten akuten Nierenversagens spielen.<sup>134,135</sup> Indometacin könnte so ebenfalls durch seine anti-inflammatorische Wirkung den Ischämie-Reperfusionsschaden reduzieren und dadurch das renale Outcome nach iANV verbessern. Dieser Fragestellung widmeten sich weiterführend Schneider und Meusel et al. 2009, indem sie

immunhistologisch die Einwanderung von ED-1 positiven Zellen, wie zum Beispiel Monozyten oder Makrophagen, in den Nierenkortex maßen.<sup>125</sup> Es zeigte sich, dass niedrig dosiertes Indometacin (1mg/kg) die Ischämie induzierte Monozyten-Einwanderung nicht verhindern konnte. Da man annimmt, dass die Einwanderung von ED-1 positiven Zellen Teil einer inflammatorischen Antwort nach einer renalen Ischämie ist<sup>121,136,137</sup>, deutet dieses Ergebnis daraufhin, dass der positive Effekt von Indometacin auf die renale Funktion nicht auf die Inhibition der zellulären Inflammation zurückzuführen ist. Die Daten von Sauvant et al. 2010 unterstützen diese Hypothese.<sup>138</sup> Die Arbeitsgruppe untersuchte den Effekt von Indometacin auf die Inflammationsmarker NF-κB und MCP-1 (Monozyten-chemotaktisches Protein 1) im Ischämie-Reperusionsmodell in der proximalen Tubuluszelllinie NRK-52E. Die Aktivierung von NF-κB gilt als kritisch bei der Entstehung von Inflammationsprozessen und findet in der Niere nach einer Ischämie statt.<sup>139</sup> Weiterhin induziert NF-κB die Synthese von MCP-1, welches wiederum die Einwanderung von Monozyten und T-Lymphozyten stimuliert.<sup>140,141</sup> Sauvant et al. 2010 konnten zeigen, dass Indometacin die Ischämie induzierte Aktivierung von NF-κB und Synthese von MCP-1 nicht beeinflusst.

Demgegenüber stehen die Ergebnisse der Arbeitsgruppe um Feitoza et al. 2009.<sup>117</sup> Hier wurde der Effekt von Indometacin auf die Inflammationsprozesse, die durch das iANV getriggert werden, untersucht. Es zeigte sich, dass die Tiere, die mit Indometacin therapiert wurden, eine verminderte Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies aufwiesen, welche normalerweise mit oxidativem Stress und Zelltod einhergehen.<sup>142</sup> Es wurde weniger Myeloperoxidase als Zeichen einer Einwanderung von neutrophilen Granulozyten im Nierengewebe nachgewiesen und unter Indometacintherapie wurden weniger proinflammatorische Zytokine wie Interferon-γ, Tumornekrosefaktor-α oder Interleukin-12 p70 ausgeschüttet.<sup>117</sup> Diese Ergebnisse deuten also daraufhin, dass Indometacin einen modulierenden Effekt auf etablierte Inflammationsmarker nach iANV hat und somit eine Hemmung von Inflammationsprozessen vorliegen kann.

Da in den oben genannten Arbeiten<sup>117,125,138</sup> jedoch nur Teile der komplexen Immunantwort nach ischämisch bedingtem akuten Nierenversagen betrachtet wurden, lässt sich letztendlich keine eindeutige Aussage treffen und weitere Studien werden nötig sein, um dieses umfassende Thema genauer zu verstehen.

#### **4.6 Dosisfindung**

Indometacin wurde gegen Ende der Ischämiephase intraperitoneal als Einmaldosis in einer Konzentration von 1mg/kg Körpergewicht gegeben. Diese Dosierung wurde gewählt, um die Gefahr einer möglicherweise renal toxischen Dosierung und einer kritischen Verschlechterung der Nierenperfusion zu minimieren. In diesem Zusammenhang ist beschrieben, dass die renale Durchblutung vor allem in der Medulla von Prostaglandin E<sub>2</sub> abhängig ist.<sup>143</sup> Da sich jedoch bei 1mg/kg KG Indometacin keine Auswirkungen auf die PAH Clearance der Sham Tiere zeigen, besteht offensichtlich kein wesentlicher Effekt auf die physiologische Nierendurchblutung in dieser niedrigen Dosis. Weiterhin ist publiziert, dass sich Indometacin mehr als 25fach im proximalen Tubulus der Ratte anreichert.<sup>144</sup> Bei einer Dosis von 1mg/kg KG Indometacin sollte daraus eine Konzentration von ~70 µM im proximalen Tubulus resultieren. Es wird also eine Konzentration erreicht, mit der man in der Lage ist, sowohl COX-1 (IC<sub>50</sub> = 0,018 µM) als auch COX-2 (IC<sub>50</sub> = 0,048 µM) komplett zu hemmen, selbst wenn alle anderen renalen Konzentrationsmechanismen neben der Akkumulation im proximalen Tubulus vernachlässigt werden.

Für weitere Untersuchungen zur Pathophysiologie des ischämisch bedingten akuten Nierenversagens und der Wirkung von Indometacin als nicht-selektiver COX-Inhibitor wären die Auswirkungen einer Dosisänderung von Indometacin sicher sehr interessant. Es wäre hierbei ebenfalls zu klären, ob auch niedrigere oder höhere Dosen als 1mg/kg einen positiven Effekt im iANV zeigen und ob höhere Dosierungen die befürchtete renale Toxizität aufweisen. Wenn Indometacin in noch niedrigeren, als in der angewendeten Dosierung (1mg/kg),

ebenfalls erfolgreich einsetzbar wäre, würde diese aufgrund des zusätzlichen Sicherheitsaspekts in der klinischen Anwendung eine höhere Akzeptanz finden. Somit sollte es also Aufgabe weiterer Charakterisierungen sein, diese Dosis-Wirkungsbeziehungen von Indometacin im iANV zu untersuchen, um eine mögliche, neue Therapiemöglichkeit nach iANV weiter zu entwickeln.

#### **4.7 Ausblick**

Neben der Dosisfindung gibt es noch viele weitere Forschungsperspektiven auf der Grundlage der positiven Wirkung von Indometacin auf die Expression und Funktion der OAT-1 und OAT-3. Auch sie könnten für zukünftige Arbeiten von besonderem Interesse sein.

Es ist beschrieben, dass Probenecid den organischen Anionentransport in den proximalen Tubuluszellen durch OAT-1 und OAT-3 hemmt.<sup>145</sup> Um zu belegen, dass Prostaglandin E<sub>2</sub> wirklich eine Herunterregulation und somit Funktionsminderung der OAT-1 und OAT-3 im iANV bewirkt, könnte man so zum Beispiel Indometacin in Kombination mit Probenecid applizieren. Die positive Wirkung der verminderten Prostaglandin E<sub>2</sub> Synthese durch die Gabe von Indometacin müsste durch Probenecid zumindest teilweise wieder aufgehoben werden. Durch die Indometacintherapie würde zwar die Expression und Funktion von OAT-1 und OAT-3 wiederhergestellt, Probenecid würde die Funktion aber auf andere Weise hemmen und somit zu einem schlechten renalen Outcome im iANV führen. Dies sind hypothetische Überlegungen, die in weiteren Untersuchungen verifiziert werden müssen.

Auch die Verwendung von selektiven COX-Inhibitoren wäre für zukünftige Forschungsaspekte durchaus interessant. Wie bereits erwähnt sind zwei Isoformen der Cyclooxygenasen beschrieben: die konstitutive COX-1, der physiologische Funktionen wie die NaCl- und H<sub>2</sub>O-Ausscheidung und die Nierendurchblutung<sup>53</sup> zugeschrieben und die induzierbare COX-2, der pathophysiologische Funktionen wie Inflammation und Fieber zugewiesen werden.<sup>57,58</sup> Es gibt bereits einige Studien, die sich mit der Rolle von COX-2 in

der geschädigten Niere befassten, jedoch bislang mit sich widersprechenden Ergebnissen. So wurde gezeigt, dass eine Vorbehandlung mit dem COX-2-Inhibitor Rofecoxib vor iANV den renalen Schaden nach Ischämie-Reperfusionsschaden verringern kann.<sup>133</sup> Eine andere Studie demonstrierte, dass die kontinuierliche intrarenale Infusion von Parecoxib, ebenfalls ein COX-2-Inhibitor, die Nierenfunktion während einer Ischämie induziert durch suprarenale Gefäßabklemmung günstig beeinflussen konnte.<sup>146</sup> Andererseits bedingte die COX-2-Inhibition in einer weiteren Studie eine Natrium-sensitive Hypertension und besonders bei älteren Patienten mit renalen Komplikationen führte die Gabe von COX-2-Hemmern zu einer Reduktion der GFR und einer verminderten Natriumausscheidung über den Urin.<sup>147,148</sup> Studien, die eine selektive COX-1-Inhibition im iANV untersuchen, sind bisher sehr rar.<sup>149,150</sup> So könnten weitere Arbeiten zum Beispiel den Effekt des selektiven COX-1-Inhibitors SC-560 im ischämisch bedingten akuten Nierenversagen untersuchen. SC-560 ist 700-mal selektiver für COX-1 als für COX-2 und konnte bereits in anderen Organen einen positiven Effekt zeigen.<sup>150-152</sup>

Nicht zuletzt ist die Betrachtung der Prostaglandin E<sub>2</sub> Rezeptoren (EP1 - 4) und der durch diese vermittelten Signalkaskaden ein sinnvoller Ansatzpunkt für weitere Forschungsvorhaben. Es ist noch wenig über die genauen Signalwege, die Verteilung der Rezeptoren in der Niere und letztlich deren Funktionen bekannt.<sup>51,143</sup> Wenn diese Aspekte besser verstanden sind, könnte man jedoch gezielt Therapieformen entwickeln, bei denen man nur einen bestimmten EP-Rezeptor antagonisiert. Somit könnte man versuchen die positiven Wirkungen von Prostaglandin E<sub>2</sub> zum Beispiel in Bezug auf die Nierendurchblutung, aber auch die günstigen Effekte einer Prostaglandinhemmung auf die Funktion der OAT-1 und OAT-3 zu nutzen. Wie bereits erwähnt besteht hier aber noch enormer Forschungsbedarf und es bleibt abzuwarten, ob diese theoretischen Überlegungen dann in die Praxis übertragbar sind. Zweifellos wurde jedoch mit dieser Arbeit ein spannendes Gebiet eröffnet, in dem es sich lohnt weiter zu forschen.



## 5 Zusammenfassung

Aus Voruntersuchungen geht hervor, dass die Expression der organischen Anionentransporter OAT-1 und OAT-3 durch Prostaglandin E<sub>2</sub> herabgesetzt wird und dass beide Transporter im ischämisch bedingten akuten Nierenversagen herunter reguliert werden. Da zudem Prostaglandin E<sub>2</sub> im iANV vermehrt vorliegt und von Cyclooxygenasen gebildet wird, wurde in dieser Arbeit der Effekt von Indometacin als nicht-selektiver COX-Inhibitor auf die Expression und Funktion von OAT-1 und OAT-3, sowie auf die gesamte Nierenfunktion untersucht.

Das ischämisch bedingte akute Nierenversagen wurde bei Ratten durch bilaterales Abklemmen der Aa. renales über 45 Minuten induziert. Indometacin (1mg/kg) wurde hierbei intraperitoneal gegen Ende der Ischämiephase appliziert. Die Gruppeneinteilung erfolgte in Gruppen mit Gefäßabklemmung jeweils mit bzw. ohne Indometacingabe und in Gruppen mit Scheinoperationen. Die Expression von OAT-1 und OAT-3 wurde mithilfe von rt-PCR und Western Blot Verfahren bestimmt, deren Funktion anhand der PAH Nettosekretion ermittelt und die Nierenfunktion mithilfe von PAH- und Inulin Clearance analysiert. Alle Parameter wurde 24h nach renaler Ischämie betrachtet.

In Ischämie-Tieren konnte Indometacin die Expression von OAT-1 und OAT-3 und die PAH Nettosekretion wiederherstellen. Zusätzlich vermochte Indometacin auch die Nierenfunktion signifikant gegenüber den Ischämie-Tieren ohne Therapie zu verbessern. So lässt sich zusammenfassend sagen, dass niedrig dosiertes Indometacin eine Herunterregulation von OAT-1 und OAT-3 nach ischämisch bedingtem akuten Nierenversagen verhindert und einen relevanten protektiven Effekt auf die Nierenfunktion zeigt.

## 6 Literaturverzeichnis

1. Schrier, R.W., Wang, W., Poole, B. & Mitra, A. Acute renal failure: definitions, diagnosis, pathogenesis, and therapy. in *The Journal of clinical investigation*, Vol. 114 5-14 (2004).
2. Himmelfarb, J. & Ikizler, T.A. Acute kidney injury: changing lexicography, definitions, and epidemiology. *Kidney international* 71, 971-976 (2007).
3. Herold, G. u. Mitarbeiter. *Innere Medizin. Eine vorlesungsorientierte Darstellung. Mit ICD 10-Schlüssel im Text und Stichwortverzeichnis* (Dr. Gerd Herold, 2008).
4. Lameire, N.H. & Vanholder, R. Pathophysiology of ischaemic acute renal failure. *Best practice & research* 18, 21-36 (2004).
5. Mehta, R.L., *et al.* Acute Kidney Injury Network: report of an initiative to improve outcomes in acute kidney injury. *Critical care (London, England)* 11, R31 (2007).
6. Bellomo, R., Ronco, C., Kellum, J.A., Mehta, R.L. & Palevsky, P. Acute renal failure - definition, outcome measures, animal models, fluid therapy and information technology needs: the Second International Consensus Conference of the Acute Dialysis Quality Initiative (ADQI) Group. *Critical care (London, England)* 8, R204-212 (2004).
7. Endre, Z.H. Acute kidney injury: definitions and new paradigms. *Advances in chronic kidney disease* 15, 213-221 (2008).
8. Goldberg, R. & Dennen, P. Long-term outcomes of acute kidney injury. *Advances in chronic kidney disease* 15, 297-307 (2008).
9. Nash, K., Hafeez, A. & Hou, S. Hospital-acquired renal insufficiency. *Am J Kidney Dis* 39, 930-936 (2002).
10. Uchino, S., *et al.* Acute renal failure in critically ill patients: a multinational, multicenter study. *Jama* 294, 813-818 (2005).
11. Mehta, R.L., *et al.* Spectrum of acute renal failure in the intensive care unit: the PICARD experience. *Kidney international* 66, 1613-1621 (2004).

12. Metnitz, P.G., *et al.* Effect of acute renal failure requiring renal replacement therapy on outcome in critically ill patients. *Critical care medicine* 30, 2051-2058 (2002).
13. Hasper, D. [Acute renal failure - how and when to treat?]. *Anesthesiol Intensivmed Notfallmed Schmerzther* 43, 286-291; quiz 292 (2008).
14. Chertow, G.M., Burdick, E., Honour, M., Bonventre, J.V. & Bates, D.W. Acute kidney injury, mortality, length of stay, and costs in hospitalized patients. *J Am Soc Nephrol* 16, 3365-3370 (2005).
15. Liano, F., *et al.* Long-term outcome of acute tubular necrosis: a contribution to its natural history. *Kidney international* 71, 679-686 (2007).
16. Lins, R.L., Elseviers, M.M. & Daelemans, R. Severity scoring and mortality 1 year after acute renal failure. *Nephrol Dial Transplant* 21, 1066-1068 (2006).
17. Ahlstrom, A., Tallgren, M., Peltonen, S., Rasanen, P. & Pettila, V. Survival and quality of life of patients requiring acute renal replacement therapy. *Intensive care medicine* 31, 1222-1228 (2005).
18. Kierdorf, H.P. [Acute renal failure: diagnosis and treatment]. *Dtsch Med Wochenschr* 131, 2475-2479 (2006).
19. Faubel, S. Pulmonary complications after acute kidney injury. *Advances in chronic kidney disease* 15, 284-296 (2008).
20. Levy, E.M., Viscoli, C.M. & Horwitz, R.I. The effect of acute renal failure on mortality. A cohort analysis. *Jama* 275, 1489-1494 (1996).
21. Herget-Rosenthal, S., Glorieux, G., Jankowski, J. & Jankowski, V. Uremic toxins in acute kidney injury. *Seminars in dialysis* 22, 445-448 (2009).
22. Li, X., Hassoun, H.T., Santora, R. & Rabb, H. Organ crosstalk: the role of the kidney. *Current opinion in critical care* 15, 481-487 (2009).
23. Kielstein, J.T. Akutes Nierenversagen. in *Dialysefibel*, Vol. 3rd Edition (ed. Schönweiß, G.) 158-171 (Abakiss Verlags-GmbH, Bad Kissingen 2006).

24. Ramaswamy, D., *et al.* Maintenance and recovery stages of postischemic acute renal failure in humans. *American journal of physiology* 282, F271-280 (2002).
25. Bonventre, J.V. & Weinberg, J.M. Recent advances in the pathophysiology of ischemic acute renal failure. *J Am Soc Nephrol* 14, 2199-2210 (2003).
26. Weight, S.C., Bell, P.R. & Nicholson, M.L. Renal ischaemia--reperfusion injury. *The British journal of surgery* 83, 162-170 (1996).
27. Kribben, A., Edelstein, C.L. & Schrier, R.W. Pathophysiology of acute renal failure. *Journal of nephrology* 12 Suppl 2, S142-151 (1999).
28. Daugharty, T.M. & Brenner, B.M. Reversible hemodynamic defect in glomerular filtration rate after ischemic injury. *The American journal of physiology* 228, 1436-1439 (1975).
29. Conger, J.D. Vascular alterations in acute renal failure: roles in initiation and maintenance. in *Acute Renal Failure - A Companion to Brenner and Rector's The Kidney* (ed. Molitoris, B.A. & Finn, W.F.) 13-29 (Saunders, Philadelphia, 2001).
30. Conger, J.D. & Weil, J.V. Abnormal vascular function following ischemia-reperfusion injury. *J Investig Med* 43, 431-442 (1995).
31. Oken, D.E. Hemodynamic basis for human acute renal failure (vasomotor nephropathy). *The American journal of medicine* 76, 702-710 (1984).
32. Molitoris, B.A. & Marrs, J. The role of cell adhesion molecules in ischemic acute renal failure. *The American journal of medicine* 106, 583-592 (1999).
33. Sheridan, A.M. & Bonventre, J.V. Cell biology and molecular mechanisms of injury in ischemic acute renal failure. *Current opinion in nephrology and hypertension* 9, 427-434 (2000).
34. Thadhani, R., Pascual, M. & Bonventre, J.V. Acute renal failure. *The New England journal of medicine* 334, 1448-1460 (1996).

35. Molitoris, B.A., Dahl, R. & Geerdes, A. Cytoskeleton disruption and apical redistribution of proximal tubule Na(+)-K(+)-ATPase during ischemia. *The American journal of physiology* 263, F488-495 (1992).
36. Schnermann, J. Homer W. Smith Award lecture. The juxtaglomerular apparatus: from anatomical peculiarity to physiological relevance. *J Am Soc Nephrol* 14, 1681-1694 (2003).
37. Racusen, L.C. The morphologic basis of acute renal failure. in *Acute Renal Failure - A Companion to Brenner and Rector's The Kidney* (ed. Molitoris, B.A. & Finn, W.F.) 1-12 (Saunders, Philadelphia, 2001).
38. Lieberthal, W. & Nigam, S.K. Acute renal failure. I. Relative importance of proximal vs. distal tubular injury. *The American journal of physiology* 275, F623-631 (1998).
39. Bonventre, J.V. Pathophysiology of acute kidney injury: roles of potential inhibitors of inflammation. *Contributions to nephrology* 156, 39-46 (2007).
40. Sutton, T.A., Fisher, C.J. & Molitoris, B.A. Microvascular endothelial injury and dysfunction during ischemic acute renal failure. *Kidney international* 62, 1539-1549 (2002).
41. Rabb, H. & Postler, G. Leucocyte adhesion molecules in ischaemic renal injury: kidney specific paradigms? *Clinical and experimental pharmacology & physiology* 25, 286-291 (1998).
42. Chatterjee, P.K., Cuzzocrea, S. & Thiemeermann, C. Inhibitors of poly (ADP-ribose) synthetase protect rat proximal tubular cells against oxidant stress. *Kidney international* 56, 973-984 (1999).
43. Espinosa, G., *et al.* Role of endothelin in the pathophysiology of renal ischemia-reperfusion in normal rabbits. *Kidney international* 50, 776-782 (1996).
44. Caramelo, C., *et al.* Role of endothelium-related mechanisms in the pathophysiology of renal ischemia/reperfusion in normal rabbits. *Circulation research* 79, 1031-1038 (1996).
45. Bonventre, J.V. Dedifferentiation and proliferation of surviving epithelial cells in acute renal failure. *J Am Soc Nephrol* 14 Suppl 1, S55-61 (2003).

46. Ho, K.M. & Sheridan, D.J. Meta-analysis of frusemide to prevent or treat acute renal failure. *BMJ (Clinical research ed)* 333, 420 (2006).
47. Chertow, G.M., Sayegh, M.H., Allgren, R.L. & Lazarus, J.M. Is the administration of dopamine associated with adverse or favorable outcomes in acute renal failure? Auriculin Anaritide Acute Renal Failure Study Group. *The American journal of medicine* 101, 49-53 (1996).
48. Tumlin, J.A. Impaired blood flow in acute kidney injury: pathophysiology and potential efficacy of intrarenal vasodilator therapy. *Current opinion in critical care* 15, 514-519 (2009).
49. Jaschinski, U. & Lichtwarck-Aschoff, M. [Acute perioperative disturbances of renal function. Strategies for prevention and therapy]. *Der Anaesthetist* 58, 829-847; quiz 848-829 (2009).
50. Oliver, J.A., Sciacca, R.R., Pinto, J. & Cannon, P.J. Participation of the prostaglandins in the control of renal blood flow during acute reduction of cardiac output in the dog. *The Journal of clinical investigation* 67, 229-237 (1981).
51. Hao, C.M. & Breyer, M.D. Physiological regulation of prostaglandins in the kidney. *Annual review of physiology* 70, 357-377 (2008).
52. Smith, W.L. Prostanoid biosynthesis and mechanisms of action. *The American journal of physiology* 263, F181-191 (1992).
53. Kam, P.C. & See, A.U. Cyclo-oxygenase isoenzymes: physiological and pharmacological role. *Anaesthesia* 55, 442-449 (2000).
54. Botting, R.M. Inhibitors of cyclooxygenases: mechanisms, selectivity and uses. *J Physiol Pharmacol* 57 Suppl 5, 113-124 (2006).
55. Whittle, B.J., Boughton-Smith, N.K., Moncada, S. & Vane, J.R. Actions of prostacyclin (PGI<sub>2</sub>) and its product, 6-oxo-PGF<sub>1</sub>α on the rat gastric mucosa in vivo and in vitro. *Prostaglandins* 15, 955-967 (1978).
56. Funk, C.D., Funk, L.B., Kennedy, M.E., Pong, A.S. & Fitzgerald, G.A. Human platelet/erythrocyte cell prostaglandin G/H synthase: cDNA cloning, expression, and gene chromosomal assignment. *Faseb J* 5, 2304-2312 (1991).

57. Dubois, R.N., *et al.* Cyclooxygenase in biology and disease. *Faseb J* 12, 1063-1073 (1998).
58. Miller, S.B. Prostaglandins in health and disease: an overview. *Seminars in arthritis and rheumatism* 36, 37-49 (2006).
59. Vane, J.R. Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for aspirin-like drugs. *Nature: New biology* 231, 232-235 (1971).
60. Harris, R.C. COX-2 and the kidney. *Journal of cardiovascular pharmacology* 47 Suppl 1, S37-42 (2006).
61. Forth W., H.D., Rummel W. *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie*, (Urban & Fischer, München, 2005).
62. Warner, T.D., *et al.* Nonsteroid drug selectivities for cyclo-oxygenase-1 rather than cyclo-oxygenase-2 are associated with human gastrointestinal toxicity: a full in vitro analysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96, 7563-7568 (1999).
63. Smith, W.L. & Lands, W.E. Stimulation and blockade of prostaglandin biosynthesis. *The Journal of biological chemistry* 246, 6700-6702 (1971).
64. Kulmacz, R.J. & Lands, W.E. Stoichiometry and kinetics of the interaction of prostaglandin H synthase with anti-inflammatory agents. *The Journal of biological chemistry* 260, 12572-12578 (1985).
65. Blobaum, A.L. & Marnett, L.J. Structural and functional basis of cyclooxygenase inhibition. *Journal of medicinal chemistry* 50, 1425-1441 (2007).
66. Lüllmann H., M.K., Hein L. *Pharmakologie und Toxikologie*, (Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 2006).
67. FitzGerald, G.A. & Loll, P. COX in a crystal ball: current status and future promise of prostaglandin research. *The Journal of clinical investigation* 107, 1335-1337 (2001).
68. Herschman, H.R. Prostaglandin synthase 2. *Biochimica et biophysica acta* 1299, 125-140 (1996).
69. Murakami, M., Nakatani, Y., Tanioka, T. & Kudo, I. Prostaglandin E synthase. *Prostaglandins & other lipid mediators* 68-69, 383-399 (2002).

70. Narumiya, S. & FitzGerald, G.A. Genetic and pharmacological analysis of prostanoid receptor function. *The Journal of clinical investigation* 108, 25-30 (2001).
71. Breyer, M.D. & Breyer, R.M. Prostaglandin receptors: their role in regulating renal function. *Current opinion in nephrology and hypertension* 9, 23-29 (2000).
72. Breyer, R.M., *et al.* Cloning and expression of the rabbit prostaglandin EP4 receptor. *The American journal of physiology* 270, F485-493 (1996).
73. Guan, Y., *et al.* Prostaglandin E2 inhibits renal collecting duct Na<sup>+</sup> absorption by activating the EP1 receptor. *The Journal of clinical investigation* 102, 194-201 (1998).
74. DiBona, G.F. Prostaglandins and nonsteroidal anti-inflammatory drugs. Effects on renal hemodynamics. *The American journal of medicine* 80, 12-21 (1986).
75. Arisz, L., Donker, A.J., Brentjens, J.R. & van der Hem, G.K. The effect of indomethacin on proteinuria and kidney function in the nephrotic syndrome. *Acta medica Scandinavica* 199, 121-125 (1976).
76. Walshe, J.J., Brentjens, J.R., Costa, G.G., Andres, G.A. & Venuto, R.C. Abdominal pain associated with IgA nephropathy. Possible mechanism. *The American journal of medicine* 77, 765-767 (1984).
77. Antillon, M., *et al.* Effects of oral prostaglandins on indomethacin-induced renal failure in patients with cirrhosis and ascites. *The Journal of rheumatology* 20, 46-49 (1990).
78. Yared, A., Kon, V. & Ichikawa, I. Mechanism of preservation of glomerular perfusion and filtration during acute extracellular fluid volume depletion. Importance of intrarenal vasopressin-prostaglandin interaction for protecting kidneys from constrictor action of vasopressin. *The Journal of clinical investigation* 75, 1477-1487 (1985).
79. Edwards, R.M. Effects of prostaglandins on vasoconstrictor action in isolated renal arterioles. *The American journal of physiology* 248, F779-784 (1985).



80. Traynor, T.R., Smart, A., Briggs, J.P. & Schnermann, J. Inhibition of macula densa-stimulated renin secretion by pharmacological blockade of cyclooxygenase-2. *The American journal of physiology* 277, F706-710 (1999).
81. Ichikawa, I. & Brenner, B.M. Importance of efferent arteriolar vascular tone in regulation of proximal tubule fluid reabsorption and glomerulotubular balance in the rat. *The Journal of clinical investigation* 65, 1192-1201 (1980).
82. Edwards, R.M. Segmental effects of norepinephrine and angiotensin II on isolated renal microvessels. *The American journal of physiology* 244, F526-534 (1983).
83. Ye, W., *et al.* Expression and function of COX isoforms in renal medulla: evidence for regulation of salt sensitivity and blood pressure. *American journal of physiology* 290, F542-549 (2006).
84. Qi, Z., *et al.* Opposite effects of cyclooxygenase-1 and -2 activity on the pressor response to angiotensin II. *The Journal of clinical investigation* 110, 61-69 (2002).
85. Bergstrom, G. & Evans, R.G. Mechanisms underlying the antihypertensive functions of the renal medulla. *Acta physiologica Scandinavica* 181, 475-486 (2004).
86. Guan, Z., Gobe, G., Willgoss, D. & Endre, Z.H. Renal endothelial dysfunction and impaired autoregulation after ischemia-reperfusion injury result from excess nitric oxide. *American journal of physiology* 291, F619-628 (2006).
87. Bonventre, J.V. & Yang, L. Cellular pathophysiology of ischemic acute kidney injury. *The Journal of clinical investigation* 121, 4210-4221.
88. Tokuyama, H., *et al.* Role of nitric oxide and prostaglandin E2 in acute renal hypoperfusion. *Nephrology (Carlton, Vic)* 8, 65-71 (2003).
89. Myers, S.I., Wang, L., Liu, F. & Bartula, L.L. Suprarenal aortic clamping and reperfusion decreases medullary and cortical blood flow by decreased endogenous renal nitric oxide and PGE2 synthesis. *J Vasc Surg* 42, 524-531 (2005).

90. Tokuyama, H., *et al.* Stenosis-dependent role of nitric oxide and prostaglandins in chronic renal ischemia. *American journal of physiology* 282, F859-865 (2002).
91. Carlsen, I., *et al.* Increased cyclooxygenase-2 expression and prostaglandin E2 production in pressurized renal medullary interstitial cells. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 299, R823-831.
92. Hao, C.M., Komhoff, M., Guan, Y., Redha, R. & Breyer, M.D. Selective targeting of cyclooxygenase-2 reveals its role in renal medullary interstitial cell survival. *The American journal of physiology* 277, F352-359 (1999).
93. Jakobsson, P.J., Thoren, S., Morgenstern, R. & Samuelsson, B. Identification of human prostaglandin E synthase: a microsomal, glutathione-dependent, inducible enzyme, constituting a potential novel drug target. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96, 7220-7225 (1999).
94. Inui, K.I., Masuda, S. & Saito, H. Cellular and molecular aspects of drug transport in the kidney. *Kidney international* 58, 944-958 (2000).
95. Perri, D., Ito, S., Rowsell, V. & Shear, N.H. The kidney--the body's playground for drugs: an overview of renal drug handling with selected clinical correlates. *The Canadian journal of clinical pharmacology = Journal canadien de pharmacologie clinique* 10, 17-23 (2003).
96. van Montfoort, J.E., *et al.* Drug uptake systems in liver and kidney. *Current drug metabolism* 4, 185-211 (2003).
97. Dantzler, W.H. Renal organic anion transport: a comparative and cellular perspective. *Biochimica et biophysica acta* 1566, 169-181 (2002).
98. El-Sheikh, A.A., Masereeuw, R. & Russel, F.G. Mechanisms of renal anionic drug transport. *European journal of pharmacology* 585, 245-255 (2008).
99. Kusahara, H., *et al.* Molecular cloning and characterization of a new multispecific organic anion transporter from rat brain. *The Journal of biological chemistry* 274, 13675-13680 (1999).

100. Sweet, D.H., *et al.* Organic anion transporter 3 (Slc22a8) is a dicarboxylate exchanger indirectly coupled to the Na<sup>+</sup> gradient. *American journal of physiology* 284, F763-769 (2003).
101. Wright, S.H. & Dantzler, W.H. Molecular and cellular physiology of renal organic cation and anion transport. *Physiological reviews* 84, 987-1049 (2004).
102. Speckmann, E.-J., Hescheler, J., Köhling, R. *Physiologie* (Urban & Fischer Verlag, München, Jena 2008).
103. Klinke, R., Pape, H.-C., Kurtz, A., Silbernagl, S. *Physiologie* (Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York 2009).
104. Dantzler, W.H. & Wright, S.H. The molecular and cellular physiology of basolateral organic anion transport in mammalian renal tubules. *Biochimica et biophysica acta* 1618, 185-193 (2003).
105. Terlouw, S.A., Masereeuw, R. & Russel, F.G. Modulatory effects of hormones, drugs, and toxic events on renal organic anion transport. *Biochemical pharmacology* 65, 1393-1405 (2003).
106. Reyes, J.L., Melendez, E., Alegria, A. & Jaramillo-Juarez, F. Influence of sex differences on the renal secretion of organic anions. *Endocrinology* 139, 1581-1587 (1998).
107. Buist, S.C., Cherrington, N.J. & Klaassen, C.D. Endocrine regulation of rat organic anion transporters. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals* 31, 559-564 (2003).
108. Ljubojevic, M., *et al.* Rat renal cortical OAT1 and OAT3 exhibit gender differences determined by both androgen stimulation and estrogen inhibition. *American journal of physiology* 287, F124-138 (2004).
109. Habu, Y., *et al.* Decreased activity of basolateral organic ion transports in hyperuricemic rat kidney: roles of organic ion transporters, rOAT1, rOAT3 and rOCT2. *Biochemical pharmacology* 66, 1107-1114 (2003).
110. Habu, Y., Yano, I., Okuda, M., Fukatsu, A. & Inui, K. Restored expression and activity of organic ion transporters rOAT1, rOAT3 and rOCT2 after hyperuricemia in the rat kidney. *Biochemical pharmacology* 69, 993-999 (2005).

111. Villar, S.R., Brandoni, A., Anzai, N., Endou, H. & Torres, A.M. Altered expression of rat renal cortical OAT1 and OAT3 in response to bilateral ureteral obstruction. *Kidney international* 68, 2704-2713 (2005).
112. Schneider, R., *et al.* Downregulation of organic anion transporters OAT1 and OAT3 correlates with impaired secretion of para-aminohippurate after ischemic acute renal failure in rats. *American journal of physiology* 292, F1599-1605 (2007).
113. Di Giusto, G., Anzai, N., Endou, H. & Torres, A.M. Elimination of organic anions in response to an early stage of renal ischemia-reperfusion in the rat: role of basolateral plasma membrane transporters and cortical renal blood flow. *Pharmacology* 81, 127-136 (2008).
114. Matsuzaki, T., *et al.* Downregulation of organic anion transporters in rat kidney under ischemia/reperfusion-induced acute [corrected] renal failure. *Kidney international* 71, 539-547 (2007).
115. Sauvant, C., Holzinger, H. & Gekle, M. Prostaglandin E2 inhibits its own renal transport by downregulation of organic anion transporters rOAT1 and rOAT3. *J Am Soc Nephrol* 17, 46-53 (2006).
116. Feitoza, C.Q., Sanders, H., Cenedeze, M., Camara, N.O. & Pacheco-Silva, A. Pretreatment with indomethacin protects from acute renal failure following ischemia-reperfusion injury. *Transplantation proceedings* 34, 2979-2980 (2002).
117. Feitoza, C.Q., *et al.* Modulation of inflammatory response by selective inhibition of cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 in acute kidney injury. *Inflamm Res* (2009).
118. Bradford, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry* 72, 248-254 (1976).
119. Burckhardt, G., Bahn, A. & Wolff, N.A. Molecular physiology of renal p-aminohippurate secretion. *News Physiol Sci* 16, 114-118 (2001).
120. Schneider, R., *et al.* L-Arginine counteracts nitric oxide deficiency and improves the recovery phase of ischemic acute renal failure in rats. *Kidney international* 64, 216-225 (2003).

121. Raff, U., *et al.* L-Arginine does not affect renal morphology and cell survival in ischemic acute renal failure in rats. *Nephron Physiol* 101, p39-50 (2005).
122. Zhang, Q., *et al.* Organic anion transporter OAT1 undergoes constitutive and protein kinase C-regulated trafficking through a dynamin- and clathrin-dependent pathway. *The Journal of biological chemistry* 283, 32570-32579 (2008).
123. Hocherl, K., Schmidt, C. & Bucher, M. COX-2 inhibition attenuates endotoxin-induced downregulation of organic anion transporters in the rat renal cortex. *Kidney international* 75, 373-380 (2009).
124. Kimura, H., *et al.* Human organic anion transporters and human organic cation transporters mediate renal transport of prostaglandins. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 301, 293-298 (2002).
125. Schneider, R., Meusel, M., *et al.* Low-dose indomethacin after ischemic acute kidney injury prevents downregulation of Oat1/3 and improves renal outcome. *American journal of physiology* 297, F1614-1621 (2009).
126. Russ, A.L., Haberstroh, K.M. & Rundell, A.E. Experimental strategies to improve in vitro models of renal ischemia. *Experimental and molecular pathology* 83, 143-159 (2007).
127. Kim, S.J., *et al.* Mechanism of reduced GFR in rabbits with ischemic acute renal failure. *Renal failure* 22, 129-141 (2000).
128. Hanley, M.J. Isolated nephron segments in a rabbit model of ischemic acute renal failure. *The American journal of physiology* 239, F17-23 (1980).
129. Schnermann, J., Briggs, J. . Concentration-dependent sodium chloride transport as the signal in feedback control of glomerular filtration rate. *Kidney international* 12, 582–589 (1982).
130. Tanner, G.A. & Knopp, L.C. Glomerular blood flow after single nephron obstruction in the rat kidney. *The American journal of physiology* 250, F77-85 (1986).

131. Araujo, M. & Welch, W.J. Cyclooxygenase 2 inhibition suppresses tubuloglomerular feedback: roles of thromboxane receptors and nitric oxide. *American journal of physiology* 296, F790-794 (2009).
132. Welch, W. Effects of isoprostanes on tubuloglomerular feedback: roles for TP receptors, NOS and salt intake. *American journal of physiology* 288, F757–F762 (2005).
133. Feitoza, C.Q., *et al.* Cyclooxygenase 1 and/or 2 blockade ameliorates the renal tissue damage triggered by ischemia and reperfusion injury. *International immunopharmacology* 5, 79-84 (2005).
134. Bonventre, J.V. & Zuk, A. Ischemic acute renal failure: an inflammatory disease? *Kidney international* 66, 480-485 (2004).
135. Kinsey, G.R., Li, L. & Okusa, M.D. Inflammation in acute kidney injury. *Nephron Exp Nephrol* 109, e102-107 (2008).
136. Villanueva, S., Cespedes, C., Gonzalez, A.A., Vio, C.P. & Velarde, V. Effect of ischemic acute renal damage on the expression of COX-2 and oxidative stress-related elements in rat kidney. *American journal of physiology* 292, F1364-1371 (2007).
137. Vos, I.H., *et al.* NFkappaB decoy oligodeoxynucleotides reduce monocyte infiltration in renal allografts. *Faseb J* 14, 815-822 (2000).
138. Sauvant, C., *et al.* Indomethacin corrects alterations associated with ischemia/reperfusion in an in vitro proximal tubular model. *American journal of nephrology* 32, 57-65 (2010).
139. Sanchez-Conde, P., *et al.* The comparative abilities of propofol and sevoflurane to modulate inflammation and oxidative stress in the kidney after aortic cross-clamping. *Anesthesia and analgesia* 106, 371-378, table of contents (2008).
140. Sung, F.L., Zhu, T.Y., Au-Yeung, K.K., Siow, Y.L. & O, K. Enhanced MCP-1 expression during ischemia/reperfusion injury is mediated by oxidative stress and NF-kappaB. *Kidney international* 62, 1160-1170 (2002).
141. Carr, M.W., Roth, S.J., Luther, E., Rose, S.S. & Springer, T.A. Monocyte chemoattractant protein 1 acts as a T-lymphocyte chemoattractant.

- Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91, 3652-3656 (1994).
142. Aksu, U., Demirci, C. & Ince, C. The pathogenesis of acute kidney injury and the toxic triangle of oxygen, reactive oxygen species and nitric oxide. *Contributions to nephrology* 174, 119-128.
  143. Hao, C.M. & Breyer, M.D. Physiologic and pathophysiologic roles of lipid mediators in the kidney. *Kidney international* 71, 1105-1115 (2007).
  144. Cox, P.G., van Os, C.H. & Russel, F.G. Accumulation of salicylic acid and indomethacin in isolated proximal tubular cells of the rat kidney. *Pharmacol Res* 27, 241-252 (1993).
  145. Berndt, W.O. The role of transport in chemical nephrotoxicity. *Toxicologic pathology* 26, 52-57 (1998).
  146. Hauser, B., *et al.* Effects of intrarenal administration of the cox-2 inhibitor parecoxib during porcine suprarenal aortic cross-clamping. *Shock* 24, 476-481 (2005).
  147. Zewde, T. & Mattson, D.L. Inhibition of cyclooxygenase-2 in the rat renal medulla leads to sodium-sensitive hypertension. *Hypertension* 44, 424-428 (2004).
  148. Swan, S.K., *et al.* Effect of cyclooxygenase-2 inhibition on renal function in elderly persons receiving a low-salt diet. A randomized, controlled trial. *Annals of internal medicine* 133, 1-9 (2000).
  149. Athirakul, K., Kim, H.S., Audoly, L.P., Smithies, O. & Coffman, T.M. Deficiency of COX-1 causes natriuresis and enhanced sensitivity to ACE inhibition. *Kidney international* 60, 2324-2329 (2001).
  150. Perrone, M.G., Scilimati, A., Simone, L. & Vitale, P. Selective COX-1 inhibition: A therapeutic target to be reconsidered. *Current medicinal chemistry* 17, 3769-3805 (2010).
  151. Smith, C.J., *et al.* Pharmacological analysis of cyclooxygenase-1 in inflammation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95, 13313-13318 (1998).

152. Calvello, R., *et al.* Novel selective COX-1 inhibitors suppress neuroinflammatory mediators in LPS-stimulated N13 microglial cells. *Pharmacol Res* (2011).



## 7 Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

	Seite	
Abb. 1	Vaskuläre Faktoren, die zur Pathogenese des ANV beitragen	6
Abb. 2	Strukturformel von Indometacin	9
Abb. 3	Prostaglandin E <sub>2</sub> Synthese	12
Abb. 4	Transport organischer Anionen im proximalen Tubulus der Niere	16
Abb. 5	OAT-1 mRNA nach ischämisch bedingtem akuten Nierenversagen und Gabe von 1mg/kg Indometacin	30
Abb. 6	OAT-3 mRNA nach ischämisch bedingtem akuten Nierenversagen und Gabe von 1mg/kg Indometacin	31
Abb. 7	OAT-1 Protein nach ischämisch bedingtem akuten Nierenversagen und Gabe von 1mg/kg Indometacin	32
Abb. 8	OAT-3 Protein nach ischämisch bedingtem akuten Nierenversagen und Gabe von 1mg/kg Indometacin	33
Abb. 9	PAH Nettosekretion nach ischämisch bedingtem akuten Nierenversagen und Gabe von 1mg/kg Indometacin	35
Abb. 10	Renaler Plasmafluss nach ischämisch bedingtem akuten Nierenversagen und Gabe von 1mg/kg Indometacin	37
Abb. 11	Glomeruläre Filtrationsrate nach ischämisch bedingtem akuten Nierenversagen und Gabe von 1mg/kg Indometacin	38
Tab. 1	Verwendete Antikörper im Western Blot	27

## **Danksagung**

Herrn Prof. Dr. med. Christoph Wanner danke ich für die Möglichkeit die Arbeit in der nephrologischen Abteilung der Universitätsklinik Würzburg durchzuführen.

Herrn Dr. med. Reinhard Schneider, dem direkten Betreuer der Arbeit, gilt mein besonderer Dank für die Bereitstellung der Arbeit, die sehr engagierte und hilfsbereite Betreuung bei der Planung, Durchführung und Fertigstellung dieser Arbeit.

Herrn PD Dr. rer. nat. Christoph Sauvant danke ich für die Hilfe bei der Auswertung der Daten, für seine konstruktiven Anregungen und die Durchsicht dieser Arbeit.

Ebenso bedanke ich mich bei meinen Eltern, Wolfgang und Kerstin Meusel, die mir das Studium der Humanmedizin und damit die Anfertigung dieser Arbeit ermöglicht haben.



## **Publikationen**

Schneider R, **Meusel M**, Betz B, Kersten M, Möller-Ehrlich K, Wanner C, Koepsell H, Sauvant C. Nitric oxide-induced regulation of renal organic cation transport after renal ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2011 Nov; 301(5): F997-F1004.

Schneider R, **Meusel M**, Renker S, Bauer C, Holzinger H, Roeder M, Wanner C, Gekle M, Sauvant C. Low-dose indomethacin after ischemic acute kidney injury prevents downregulation of Oat1/3 and improves renal outcome. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2009 Dec; 297(6): F1614-21.

Würzburg, den 10.Dezember 2012