

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

**Das akute Nierenversagen: Effekte des
Hämoxygenaseinhibitors Zinn-Mesoporphyrin auf
die Nierenfunktion beim akuten ischämischen
Nierenversagen der Ratte**

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der
Bayrischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg
vorgelegt von
Frieder Pullig
aus Paderborn

Würzburg, März 2008

Referent: Professor Dr. med. J. Galle
Koreferent: Professor Dr. med. C. Wanner
Dekan: Professor Dr. med. M. Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 11.03.2008

Der Promovend ist Arzt

Meinen Eltern
Sieglinde und Karl-Klaus Pullig
gewidmet

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	Seite 1
- 1.1 Das akute Nierenversagen	Seite 1
- 1.1.1 Äthiologie des akuten Nierenversagens	Seite 1
- 1.1.2 Stadien des akuten Nierenversagens	Seite 2
- 1.1.3 Definition des akuten Nierenversagens	Seite 2
- 1.1.4 Pathogenese des akuten Nierenversagens	Seite 3
- 1.2 Therapie des akuten Nierenversagens	Seite 5
- 1.3 Die Hämoxygenase	Seite 6
- 1.3.1 Häm und Hämstoffwechsel	Seite 6
- 1.3.2 Hämoxygenase-1	Seite 6
- 1.3.3 Hämoxygenase-2	Seite 9
- 1.3.4 Hämoxygenase-3	Seite 10
- 1.4 Zinn-Mesoporphyrin	Seite 10
- 1.5 NO-Stoffwechsel	Seite 11
- 1.6 Arbeitshypothese	Seite 12
2. Methodik	Seite 13
- 2.1 Die Versuchstiere	Seite 13
- 2.2 Das Operationsschema	Seite 13
- 2.3 Die Induktionsoperation	Seite 14
- 2.4 Die Entnahmeoperation	Seite 17
- 2.5 Die Inulin-Messung	Seite 19
- 2.6 Die Para-Aminohippurat-Messung	Seite 20
- 2.7 Die PAH-Nettosekretion	Seite 21
- 2.8 Die Substanzliste für die Inulin und PAH-Messung	Seite 21
- 2.9 Bestimmung von Serum-Parametern im Zentrallabor	Seite 21
- 2.10 Statistik	Seite 22

3. Ergebnisse	Seite 23
- 3.1 Der Einfluss von SnMP auf das Serum-Creatinin	Seite 23
- 3.2 Der Effekt von SnMP auf den Serum-Harnstoff	Seite 24
- 3.3 Der Einfluss von SnMP auf die Inulin-Clearance	Seite 26
- 3.4 Der Effekt von SnMP auf die PAH-Clearance	Seite 28
- 3.5 Die Wirkung von SnMP auf die Sham-Tiere	Seite 30
- 3.6 Der Einfluss von SnMP auf die PAH-Nettosekretion	Seite 33
- 3.7 Der Einfluss von SnMP auf das Serum-Bilirubin	Seite 35
- 3.8 Der Effekt von SnMP auf das Serum-CRP	Seite 37
4. Diskussion	Seite 39
- 4.1 Methodik	Seite 39
- 4.2 Diskussion der Ergebnisse	Seite 41
- 4.2.1 Die Retentions- und Clearancewerte	Seite 41
- 4.2.2 Die PAH-Nettosekretion	Seite 43
- 4.2.3 Die PAH-Clearance	Seite 44
- 4.2.4 Bilirubinwerte	Seite 45
- 4.2.5 Entzündungsparameter (CRP)	Seite 45
- 4.2.6 Stickstoffmonoxyd/Kohlenmonoxyd	Seite 46
- 4.3 Zusammenfassung und klinische Relevanz	Seite 46
5. Zusammenfassung	Seite 48
6. Literaturverzeichnis	Seite 50

1 Einleitung

1.1 Das akute Nierenversagen

Das akute Nierenversagen (ANV) ist trotz der Fortschritte der modernen Medizin eine Krankheit, deren hohe Mortalität von 50-80% auch in den letzten Jahrzehnten nicht maßgeblich gesenkt werden konnte (1-6).

Besonders gefährdet sind Patienten, die wegen eines akuten Nierenversagens oder zusätzlicher Begleitkrankheiten intensivmedizinisch behandelt werden müssen. Verkomplizierend dabei ist, dass gerade bei diesen Patienten die Inzidenz des akuten Nierenversagens mit ca. 5% besonders hoch ist (7).

1.1.1 Ätiologie des akuten Nierenversagens

Das akute Nierenversagen kann nach seiner Ätiologie in ein prärenales, renales und postrenales Nierenversagen unterteilt werden. Die Ursachen sind für jede dieser Gruppen sehr verschieden.

Das prärenale akute Nierenversagen ist meist durch zirkulatorische-ischämische Prozesse wie Schock oder Hypovolämie ausgelöst und stellt mit ca. 50% die häufigste Ursache dar. Aber auch Medikamente wie NSAR, ACE-Hemmer, Aminoglykoside und Röntgenkontrastmittel können zu einem prärenalen akuten Nierenversagen führen.

Immunologische Erkrankungen wie das Goodpasture-Syndrom oder die akute interstitielle Nephritis gehören zu den Ursachen, die das intrarenale Nierenversagen auslösen. Bei Kindern zählt das Hämolytisch-Urämische-Syndrom (enterohämorrhagische Escherichia coli Serogruppe O 157) zu den häufigsten auslösenden Faktoren. Es gibt aber noch viele weitere Ursachen des akuten Nierenversagens, wie vaskuläre Nierenerkrankungen und tubuläre Lumenverschlüsse durch Leichtketten, die beim Plasmozytom auftreten.

Durch Transportbehinderung der ableitenden Harnwege kann es zum postrenalen akuten Nierenversagen kommen (7,10,11).

In dieser Arbeit wird der Verlauf nach ischämischer Genese als die häufigste Ursache für das akute Nierenversagen untersucht.

1.1.2 Stadien des akuten Nierenversagens

Das akute Nierenversagen läuft überwiegend in vier Stadien ab, die jeweils mit typischen Komplikationen einhergehen.

Nach der Schädigung der Niere als erstes Stadium kommt es im zweiten Stadium zur Oligo- beziehungsweise Anurie. In dieser Phase besteht vor allem die Gefahr der Überwässerung mit schwerwiegenden Folgen wie Linksherzinsuffizienz und Lungenödem. Zusätzlich kann es zur Elektrolytverschiebung mit Hyperkaliämie und metabolischer Azidose, sowie einem Anstieg der Retentionswerte mit dem klinischen Bild der Urämie mit den Allgemeinsymptomen wie rascher Ermüdbarkeit, Übelkeit und Somnolenz kommen.

Im dritten Stadium tritt die Niere in eine polyurische Phase, die aufgrund noch gestörter Rückresorptionsmechanismen mit großem Verlust von Serumelektrolyten, wie Kalium und Natrium einhergehen kann, die unter anderem zu Herzrhythmusstörungen führen können.

Nach der Polyurie kommt es im günstigsten Fall zur Restitutio ad integrum mit Normurie und kompletter Wiederherstellung aller renalen Funktionen (7).

1.1.3 Definition des akuten Nierenversagens

Das akute Nierenversagen ist unter anderem durch einen plötzlichen Verlust der Entgiftungsfunktion, Urinkonzentrationsstörung mit Verschiebungen im Elektrolyt- und Flüssigkeitshaushalt, sowie dem Hormon- und Säure-Basenhaushalt der Niere gekennzeichnet (2). Daraus lassen sich auch die Leitsymptome des akuten Nierenversagens die Oligourie (<500ml Urin/d) beziehungsweise die Anurie (<100ml Urin/d) und ein Anstieg der Retentionswerte Serum-Harnstoff und Serum-Creatinin erklären (2,7,8,9). Ca. 15% der Fälle des akuten Nierenversagens verlaufen normo- oder polyurisch und haben damit als einziges Leitsymptom den beschriebenen Anstieg von Serum-Harnstoff und Serum-Creatinin. Zusätzlich kann es je nach Schweregrad zu den bereits oben geschilderten Symptomen der Urämie kommen.

Das ansteigende Serum-Creatinin, gekoppelt mit dem Abfall der glomerulären Filtrationsrate, ist eine Möglichkeit, die Diagnose des akuten Nierenversagens zu stellen (7,2,8).

Weitere Diagnosekriterien für den Verlust der Konzentrationsfähigkeit der Niere sind ein Anstieg der fraktionierten Exkretion von Natrium auf über 2%, ein Abfall der Urinosmolalität auf unter 400mOsm/kg und ein erhöhtes Vorkommen von tubulären Epithelzellen im Urinsediment. Trotz intensiver Forschung und klinischer Erprobung von KIM-1 (kidney injury molecule-1) (12,13) oder Interleukin-18 (15), die hoffnungsvolle experimentelle Ansätze gezeigt hatten, fehlt es an Biomarkern für das akute Nierenversagen, wie es sie mit dem Troponin schon beim Herzinfarkt gibt. Zusätzlich macht das Ausbleiben von Frühsymptomen es oft schwierig, das akute Nierenversagen und das Ausmaß der Erkrankung zu diagnostizieren. Ein Grund dafür, dass man noch keinen geeigneten Biomarker für das akute Nierenversagen gefunden hat, liegt auch an der Tatsache, dass man die Pathogenese des akuten Nierenversagens noch nicht ausreichend erforscht und verstanden hat.

1.1.4 Pathogenese des akuten Nierenversagens

Es gibt heute verschiedene Ansätze das akute Nierenversagen zu erklären, wobei es sich wahrscheinlich um ein Mischbild aus verschiedenen Reaktionen handelt. Dazu gehören die Vasokonstriktion vor allem der afferenten Arteriolen, der Zelluntergang mit Verlust der Zellpolarität, und nach neusten Erkenntnissen, eine komplexe Inflammationsreaktion im Nierenparenchym (7,16,18). Geht man von der häufigsten Ursache des akuten Nierenversagens, der Ischämie aus, führt der Sauerstoffmangel in den afferenten Arteriolen der Glomeruli zu einem Anstieg des zytosolischen Calciums und damit zur Vasokonstriktion (19). Zusätzlich kommt es zur erhöhten Sensibilität für Vasokonstriktoren und nervale Stimuli (23,24), was schließlich zum Verlust der Autoregulation des renalen Blutflusses führt. Durch Endothelschäden wird die Vasokonstriktion aufgrund sinkender Konzentrationen von NO, vasodilatierenden Prostaglandinen und einem vasokonstriktiv wirkenden zunehmenden Endothelin-Spiegel verstärkt. Durch ansteigende inflammatorische Mediatoren wie Zytokine, Eicosanoide und Sauerstoffradikale, kommt es unter anderem zur Aktivierung von

Leukozyten, die zu weiteren Endothelschäden und so zu einem Circulus vitiosus führen (20,21,22). All diese Veränderungen führen schließlich zu einer Abnahme der glomerulären Filtrationsrate.

Es konnte gezeigt werden, dass die Glomeruli beim akuten Nierenversagen morphologisch weitgehend intakt sind (2) während die Tubuli deutliche Schädigungen aufweisen. Diese findet sich insbesondere im S3-Segment, das sich zwischen äußerer Medulla und Cortex befindet und Teile des proximalen Tubulus und den dicken aufsteigenden Ast der Henle-Schleife enthält (32,37). Deshalb nimmt man an, dass die stärksten Auswirkungen der Schädigung vor allem im Bereich der proximalen Tubuli liegen. Diese Annahme wird durch die bei Ischämie auftretende Translokation der Na⁺/K⁺ATPase von der basolateralen zur apikalen Membran im Tubulus (25,28) mit Verlust der Zellpolarität und der Fähigkeit, Natrium und Wasser zu resorbieren, gestützt. Durch die so erhöhten Konzentrationen an Natrium und Chlorid an der Macula densa kommt es zu einer weiteren Einschränkung der glomerulären Filtrationsrate, die bis zu 50% betragen kann (26). Außerdem kann es durch den Verlust der Epithelbarrieren, „Capillary leak“, zu einem Rückfluss von bereits filtrierte Substanzen kommen (27,29,36).

Die in verschiedenen Experimenten gezeigte Stauung von Primärharn in den proximal gelegenen Tubulusanteilen entsteht durch die Abschilferung des Bürstensaums des proximalen Tubulus (5) zusammen mit dem tubulär sezernierten Tamm-Horsfall-Protein was zu einer Obstruktion im distalen Tubulussegment führt. Dies geschieht dadurch, dass das Tamm-Horsfall-Protein, das als Monomer in den Tubulus kommt, durch erhöhte Natriumkonzentrationen zu einem gelartigen Polymer umgewandelt wird (31). Besonders betroffen von der Ischämie und ihren Folgen ist das bereits genannte S3-Segment. Hier kommt es im Rahmen einer Ischämie besonders schnell zu Nekrosen, die durch die energieabhängige, ATP-verbrauchende Öffnung des death-channels erfolgt (33). Die Öffnung des death-channels führt zur Nekrose der Zelle, was vor allem im proximalen Tubulus zu beobachten ist. Normalerweise bleibt dieser Kanal bei Ischämie, hohen Glycinwerten (34) und niedrigem pH (35) zum Schutz der Zelle im Rahmen der Ischämie geschlossen. Insbesondere bei einer sehr lange anhaltenden Ischämie, kommt es in der Extensionsphase, die 6-12 Stunden nach dem schädigendem

Ereignis in den wieder perfundierten Arealen auftritt, entweder zur Regeneration oder zur weiteren Schädigung der Zellen.

Da viele Zellen in den reperfundierten Arealen nach langer Schädigung nicht fähig sind, aufgrund mitochondrialer Schäden ATP als Grundlage für die ATP-abhängige Regeneration (21) zu produzieren, kommt es auch in der späten Phase nach der Initialschädigung zur Öffnung des death-channels und zur Nekrose der Zellen (39,40).

1.2 Therapie des akuten Nierenversagens

Die zur Zeit etablierte Therapie des akuten Nierenversagens hat bisher noch zu keinem zufrieden stellenden Verlauf nach akutem Nierenversagen geführt. Die Wiederherstellung beziehungsweise Verbesserung der Nierenfunktion zeigt in epidemiologischen Studien noch großen Forschungsbedarf. So wurden klinische Versuche, mit Dopamin (41) über die Dopamin-1-Rezeptoren in der Niere eine bessere Durchblutung zu erreichen, schließlich eingestellt, da kein signifikanter protektiver Effekt nachgewiesen werden konnte (42). Auch der Einsatz der Diuretika Furosemid und Mannitol können in klinischen Studien höchstens das oligurische Nierenversagen in die nicht oligurische Form umwandeln, ohne die glomeruläre Filtrationsrate signifikant zu verbessern (43-47).

Neuere klinische Therapieansätze mit ANP und IGF-1, die im Tierversuch erfolgversprechende Daten lieferten (48,49), zeigten, beim Menschen angewandt, keinen Effekt auf eine Verbesserung oder Wiederherstellung der Nierenfunktion (50,51).

In den letzten Jahren rückten verschiedene Mediatoren, die vermehrt in der ischämischen Niere auftreten, immer mehr ins Blickfeld der Forschung.

Zu diesen wahrscheinlich als Schutz vor Ischämie sehr wichtigen Mediatoren gehört unter anderen die Hämoxxygenase (52,53).

1.3 Die Hämoxygenase

1.3.1. Häm und Hämstoffwechsel

Beim akuten ischämischen Nierenversagen spielt Häm neben einer Vielzahl von anderen Faktoren eine wichtige Rolle (68,75,76). Häm dient als prosthetische Gruppe in verschiedenen Häm-Proteinen (77-79). Beim bekanntesten Häm-Protein, dem Hämoglobin, dient es zum Beispiel der Sauerstoffbindung.

Hämoglobin wird durch Oxidationsprozesse zu Biliverdin, Kohlenmonoxyd (CO) und Eisen abgebaut (69). Das hierdurch entstandene Biliverdin wird dann in einem nächsten Schritt durch die Biliverdin-Reduktase zu Bilirubin abgebaut, das vom Körper vor allem biliär ausgeschieden werden kann. Das beim Häm-Abbau freiwerdende Eisen wird größtenteils durch das Speicherprotein Ferritin (70) gebunden.

1.3.2 Hämoxygenase-1

Von der Hämoxygenase sind drei Isoformen bekannt. Die Hämoxygenase-1 (HO-1) ist in den Microsomen der Zelle lokalisiert und hat ein Molekulargewicht von 32 kDa (6).

Die Hämoxygenase-1 scheint von besonderer Bedeutung für den Schutz der von Ischämie bedrohten Zellen zu sein (56-63). Die für die Niere lebenswichtige Bedeutung der HO-1 bei Ischämie konnte bei knockout Mäusen (85) nachgewiesen werden. Die Tiere, bei denen die HO-1 nicht vorhanden war, hatten eine signifikant schlechtere Nierenfunktion und im follow-up eine 100% Mortalität bei Auftreten von Tubulusschäden.

Bei der HO-1 handelt es sich um ein Enzym, das nur unter pathologischen Bedingungen expremiert wird. Unter den, bei pathologischen Verhältnissen, vorhandenen Stimuli findet sich vor allem im proximalen Tubulus der Niere sowie in Leber und Lunge (5) die stärkste HO-1 Expression. Zu einer renalen Induktion der HO-1 kommt es in erster Linie durch eine akute renale Schädigung bei Ischämie (64,65). In zweiter Linie durch

Nephrotoxine (z.B. Cisplatin) (66), Glomerulonephritiden (67), Transplantation und Rhabdomyolyse (68). Aber auch UV-Strahlen, bakterielle Lipopolysaccharide, Cytokine und auch Häm selbst führen zur gesteigerten Expression von HO-1 im distalen und proximalen Tubulus sowie Sammelrohr (69).

Die HO-1 ist das geschwindigkeitslimitierende Enzym im Häm-Abbau durch Cytochrom P450, Biliverdin-Reduktase und HO-1 (69).

Wie oben erwähnt entstehen beim Häm-Abbau durch die HO-1 initiierte Kaskade mittels Oxidationsprozesse Biliverdin, Kohlenmonoxyd (CO) und Eisen.

Die HO-1 ist aber nicht nur für den Hämabbau wichtig, sondern auch für die damit verbundene Konzentrationszunahme an CO (71,72), da CO eine große Rolle in der Regulation des Gefäßtonus der Widerstandsgefäße spielt(14).

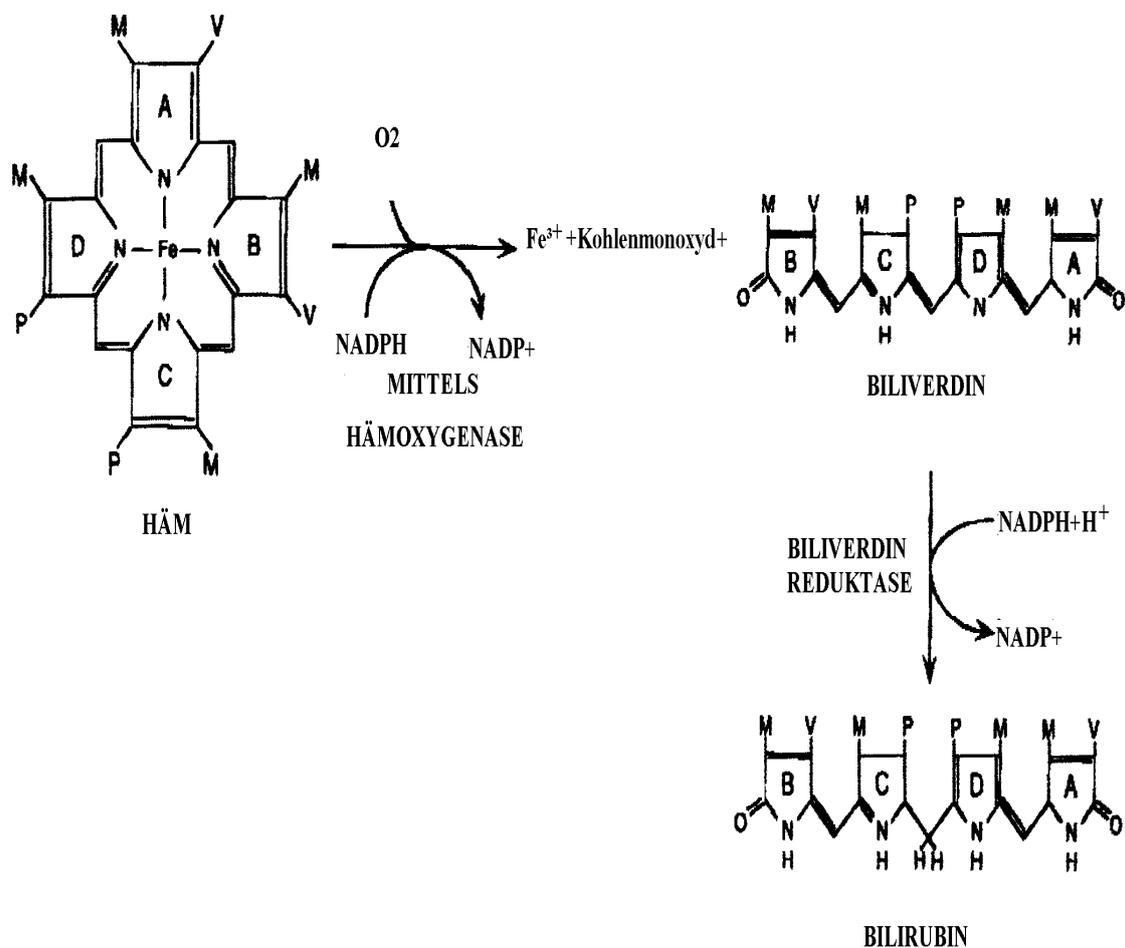


Abb. 1 Schema der von der Hämoxigenase katalysierte Reaktion des Häm-Abbaus (aus J Am Soc Nephrol 11: 965-973,2000)

Alle Stoffwechselprodukte der HO-1 können bei zu hohen Konzentrationen selbst zu toxischen Substanzen werden. So stimuliert CO freie Radikale (73), die Proteine schädigen können. Ungebundenes Eisen kann ebenfalls durch Generation freier Radikale solche Schädigungen katalysieren, und hochpathologische Konzentrationen an Serum-Bilirubin können zum Beispiel zum Ikterus neonatorum (74) führen.

Bei der Gen-Regulation von HO-1 im Rahmen des akuten Nierenversagens spielt Häm, neben einer Vielzahl von anderen Faktoren, eine wichtige Rolle (68,75,76). Beim akuten Nierenversagen kommt es zu einem starken Anstieg der Häm-Konzentration, der aus dem Zelluntergang und der Destabilisierung der Hämproteine stammt.

Beim Menschen ist das HO-1-Gen auf Chromosom 22q12 (80) lokalisiert. Es gibt sowohl positive als auch negativ regulierende Elemente für den HO-1-Promotor.

Bei niedrigen Konzentrationen von Häm kommt es durch Interaktion vom negativ wirkenden Transkriptionsfaktor Bach-1 mit den MARE-Sequenzen (Maf recognition sites) (81) zu einer Unterdrückung der HO-1 Expression (siehe Abbildung 2) (82). Kommt es beim akuten Nierenversagen zu hohen Konzentrationen an Häm, so bindet Häm den Transkriptionsfaktor Bach-1 und es können induktionsaktivierende Transkriptionsfaktoren wie Nrf-2 mit MARE (81) in Kontakt treten. Nrf-2 bildet mit dem small Maf-Protein im Zellkern ein Heterodimer (83,84) und führt so zur Geninduktion.

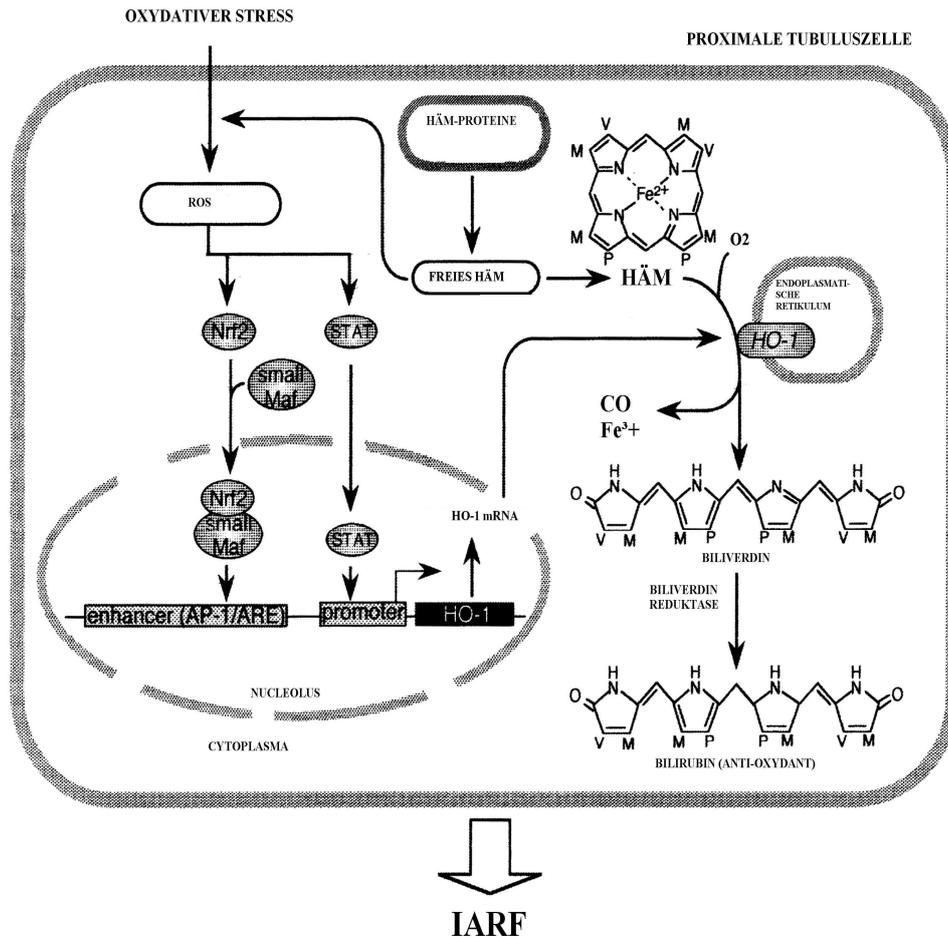


Abb. 2 Hypothetischer Mechanismus der Hämoxigenase-1 Induktion beim akuten ischämischen Nierenversagen (aus Jpn. J. Pharmacol. 88, 127-132, 2000)

1.3.3 Hämoxigenase-2

Die zweite Isoform der Hämoxigenase, die Hämoxigenase-2 (HO-2), hat ein Molekulargewicht von 36 kDa und ist vor allem in den Mitochondrien der Zelle lokalisiert. HO-1 und HO-2 haben nur eine Übereinstimmung von ca. 40% der Aminosäuren (54). Die mRNA der HO-2 konnte in vielen Geweben nachgewiesen werden, unter anderem auch in der Niere.

Die Hämoxigenase-2 (HO-2) ist ein konstitutiver Regulator für zelluläre Funktionen und dient als Häm-Bindungsmolekül. Sie kommt vor allem im Gewebe von Gehirn,

Testes, Endothel, distalem Nephron, Leber und Plexus myentericus vor. Nach neuesten Studien scheint die HO-2 für die basale CO-Produktion (93) unter physiologischen Bedingungen verantwortlich zu sein. CO spielt, wie schon erwähnt, hierbei eine wichtige Rolle bei der Regulation des Gefäßtonus und des Blutdrucks.

1.3.4 Hämoxygenase-3

Die Hämoxygenase-3 (HO-3) ist zu 90% homolog zur HO-2 (54-58). Sie dient ebenso wie die HO-2 als Häm-Bindungsmolekül und übernimmt auch im CO-Stoffwechsel eine ähnliche Funktion wie die HO-2, indem sie wahrscheinlich ebenfalls für die basale CO-Produktion mitverantwortlich ist.

1.4 Zinn-Mesoporphyrin

Das bereits in der Therapie des neonatalen Ikterus eingesetzte Zinn-Mesoporphyrin (SnMP) blockiert als Enzyminhibitor die Funktion der Hämoxygenase. SnMP wird synthetisch hergestellt und ist von seiner chemischen Struktur dem Hämoglobin sehr ähnlich. (86) Anstelle von Eisen enthält SnMP Zinn als reaktives Zentrum. Beim SnMP wurden die beiden Vinyl-Gruppen an C2 und C4 im Vergleich zum Sn-Protoporphyrin zu Ethyl-Gruppen reduziert (17). Durch seine gute Wasserlöslichkeit ist es besser einsetzbar als andere Substanzen, die zur Blockade von HO-1 führen.

Obwohl SnMP ein Inhibitor von HO-1 und HO-2 ist, konnte nachgewiesen werden, dass es gleichzeitig als Aktivator für die HO-1 Genexpression (38) fungiert und somit konsekutiv zu einem Anstieg der HO-1-Expression führt.

1.5 NO-Stoffwechsel

In der Niere hat Stickstoffmonoxyd (NO) eine Vielzahl an wichtigen Aufgaben. Dazu gehören die Regulation der renalen und glomerulären Hämodynamik (94,100), die Vermittlung der druckinduzierten Natriurese (101), die Verminderung des tubuloglomerulären Feedbacks (102) und die Hemmung der tubulären Natriumreabsorption (103).

NO wird durch die NO-Synthase (NOS) aus der Aminosäure L-Arginin gebildet, die dabei unter Mitwirkung von molekularem Sauerstoff (O₂) und NADPH zu Zitrullin verstoffwechselt wird (94,95).

Von der NOS existieren nach bisherigen Erkenntnissen drei Isoformen, die neuronale NOS (nNOS oder NOS1), die induzierbare NOS (iNOS oder NOS2) und die endotheliale NOS (eNOS oder NOS3) (95,103).

Hohe Spiegel der nNOS finden sich in der Niere vor allem in der Macula densa (105), wo NO einen Einfluss auf den tubuloglomerulären Feedbackmechanismus hat, sowie in der Medulla. In vielen Studien (106, 107, 105) konnte iNOS unter physiologischen Bedingungen nicht in der Niere nachgewiesen werden. Bei proinflammatorischen Stimuli wie Ischämie kommt es aber zu einem starken Anstieg der iNOS-Expression (94). Die eNOS findet sich vor allem im Endothel der renalen Gefäße (94).

NO spielt wie bereits erwähnt eine wichtige Rolle bei der Aufrechterhaltung des normalen Gefäßtonus in der Niere (100). Wird die NO-Synthese gehemmt, führt dies zu einem Anstieg des Gefäßwiderstandes und damit zur Reduktion des renalen Blutflusses (94).

NO vermittelt seine Wirkung, ebenso wie CO, über die Stimulation der löslichen Guanylat-Cyclase (sGC) (93), wobei NO eine viel stärkere Aktivierung der sGC als CO hervorruft.

Höchstwahrscheinlich ist CO bei intaktem NO-System für die Vasodilatation nicht von entscheidender Bedeutung. Sollte ein funktionelles NO-Defizit vorliegen, so ist CO ein wichtiger Reservemechanismus, um eine Konstriktion der afferenten Arteriolen in der Niere zu verhindern (93). Dies zeigt sich auch in steigenden CO-Spiegeln bei unspezifischer Hemmung der NOS (99).

Wie schon erwähnt wird CO unter normalen Bedingungen vor allem durch die HO-2 produziert, die damit eine wichtige Rolle für den Gefäßtonus übernimmt (97), und führt über die sGC und calciumabhängige Kaliumkanäle (98) zu einer Vasodilatation.

Wird die HO durch kompetitive Hemmstoffe wie SnMP gehemmt, führt dies zu einer Vasokonstriktion, die durch einen Mangel an NO noch verstärkt werden kann (93).

1.6 Arbeitshypothese

In dieser Arbeit soll der Einfluss von SnMP auf ein definiertes und reproduzierbares akutes ischämisches Nierenversagen über einen Beobachtungszeitraum von 14 Tagen untersucht werden.

Dabei ist der postinterventionelle Verlauf der funktionellen Parameter Inulin- und PAH-Clearance, der PAH-Nettosekretion, der Retentionswerte Serum-Creatinin und Serum-Harnstoff und weiterer Parameter der klinischen Chemie von besonderem Interesse.

Außerdem ist der funktionelle Einfluss von SnMP im Rahmen einer Sham-Operation Gegenstand der Beobachtung.

Das C-reaktive-Protein wird zur Überprüfung der peri/postinterventionellen Qualitätskontrolle, sowie als Parameter der Inflammation analysiert.

Im Rahmen dieser Untersuchung soll die Hypothese zur Diskussion gestellt werden, dass die HO-1 beim akuten Nierenversagen eine wichtige Schlüsselrolle für die Funktionsfähigkeit der Niere einnimmt.

Deshalb wird die HO-1 durch SnMP in ihrer Funktion inhibiert um die Bedeutung der HO-1 im Rahmen des akuten ischämischen Nierenversagens darzustellen und die hierdurch aktivierten Kompensationsmechanismen sowie weitere Effekte anhand der oben genannten Parameter dokumentiert.

2 Methodik

2.1 Versuchstiere

Alle in dieser Arbeit dargestellten Ergebnisse wurden in vivo am Tiermodell experimentell gewonnen. Dazu wurde an Ratten (n = 101; weibliche CD- Ratten, Körpergewicht 170-200g, von der Firma Charles River Deutschland GmbH) operativ ein akutes ischämisches Nierenversagen induziert und in einer zweiten, im Intervall folgenden Operation Analysen über verschiedene Nierenfunktionen durchgeführt.

Sämtliche operativen Eingriffe sowie die Unterbringung der Tiere, die vor der ersten Operation mindestens 24 Stunden im Tierstall verbrachten, erfolgten stets nach den Maßgaben des Tierschutzgesetzes.

Im Tierstall herrschte ein Hell-Dunkel-Zyklus von 12:12 Stunden. Die Tiere wurden mit Standardfutter (Firma Altromin GmbH-CoKG Lage, Deutschland) gefüttert und bekamen Trinkwasser ad libitum.

2.2 Operationsschema

Die Ratten, die in der vorliegenden Arbeit eingesetzt wurden, waren in fünf Gruppen randomisiert.

Zur Bestimmung der Referenzwerte wurde bei einem Teil der Tiere, die im weiteren als Nativ-Tiere (Tag 0) bezeichnet werden, nur die Entnahmeoperation (siehe 2.4) durchgeführt.

Bei allen weiteren Tieren wurde die Induktionsoperation mit definierter Ischämie der Nieren entweder nach erfolgter Gabe von 0,9% Natriumchlorid-Lösung (Clamping+NaCl-Tiere) oder Gabe von Mesoporphyrin (SnMP) (Clamping+SnMP-Tiere) durchgeführt. Als Alternativeingriff erfolgte die Induktionsoperation ohne Ischämie der Nieren mit Gabe von 0,9% Natriumchlorid-Lösung (Sham+NaCl-Tiere) beziehungsweise Mesoporphyrin (Sham+SnMP-Tiere).

Die intraperitoneale SnMP-Applikation erfolgte, beginnend vom Zeitpunkt der Induktionsoperation, maximal fünf Tage postinterventionell.

Jede einzelne Behandlungsgruppe wurde insgesamt über einen Beobachtungszeitraum von bis zu 14 Tagen postinterventionell beobachtet.

2.3 Induktionsoperation

Ziel der Induktionsoperation war es, ein definiertes und reproduzierbares akutes Nierenversagen herbeizuführen.

Für die Narkose wurden Ketavet 10mg/kg KG (Pharmacia&Upjohn GmbH, Erlangen) und Rompun 100mg/kg KG (Bayer Vital GmbH, Aachen) intraperitoneal injiziert.

Nach dem Wiegen des Tieres wurden beide Flanken rasiert und das Tier in Seitenlage auf einer Wärmeplatte (Typ 12511Medax, Nagel GmbH Kiel Deutschland) fixiert, um während der Operation eine konstante Körpertemperatur von ca. 37°C sicher zu stellen.

Die Augen wurden mit einer Salbe vor Austrocknung geschützt (Bepanthen Hoffmann La-Roche AG) und das Operationsgebiet vor dem Eingriff mit Braunol (B. Braun Melsungen AG) desinfiziert.

Anschließend wurden paravertebral 1cm caudal des Rippenbogens, Kutis, Subkutis und Muskelschicht mittels eines 2 cm langen Schnitts eröffnet, ein Retraktor eingesetzt und die Niere vorsichtig aus ihrer Fettkapsel herausgelöst.

Nach sorgfältiger Darstellung des Gefäßbündels wurde die A. renalis mit einem Ligaturfaden umschlungen, um später die Klemme schnell und sicher platzieren zu können.

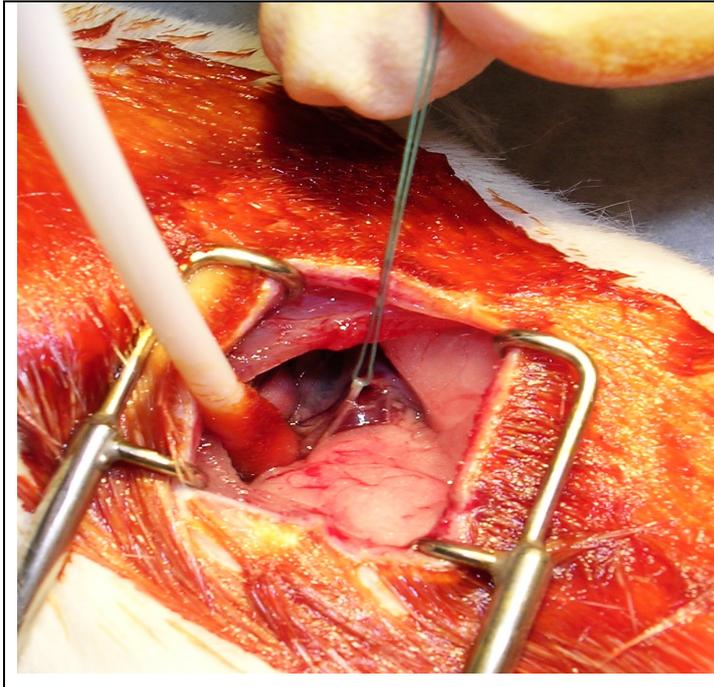


Abb. 3. Darstellung der A. renalis und Umschlingung mit einem Ligaturfaden

Anschließend wurde die Wunde kurzfristig mit einem sterilen Pflaster (Tegaderm, 3M Health Care Neuss, Deutschland) verschlossen, um den Flüssigkeitsverlust möglichst gering zu halten und die Wunde vor Infektionen zu schützen.

Das Tier wurde nun auf die kontralaterale Seite gelegt und das bereits beschriebene Procedere wiederholt.

Die Aa. renales wurden für 45 min mit Klemmen (Biemer Mikro Clip 8mm Seidel, Deutschland) über die vorplazierten Ligaturfäden beidseits abgeklemmt, so dass die arterielle Perfusion sistierte. Dieses Vorgehen wird im weiteren als Clamping bezeichnet.

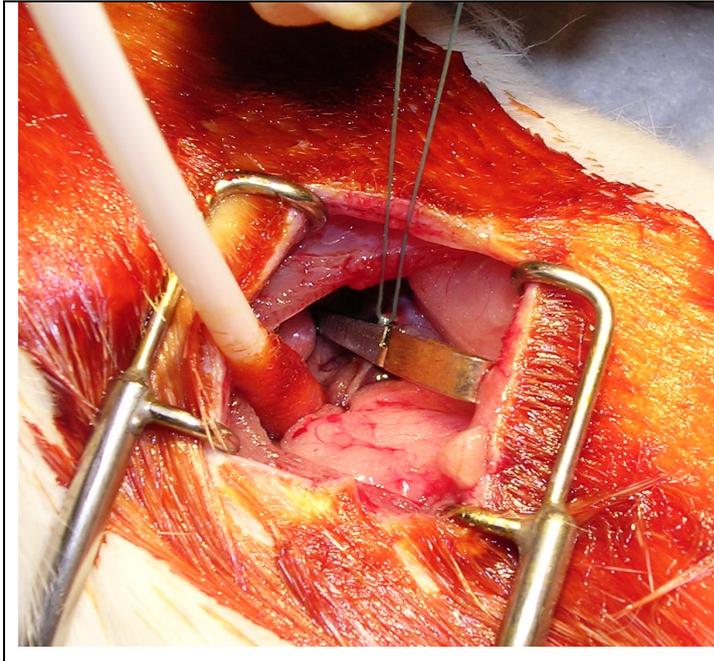


Abb. 4. Abklemmen der A. renalis

Nach einer Klemmzeit von 25 min wurde den Clamping+NaCl-Tieren 250 μ l/100g KG NaCl 0,9% intraperitoneal appliziert. Bei der Clamping+SnMP-Gruppe wurden 0,75 mg/ 100g KG SnMP (Frontier Scientific Europe Ltd Carnforth Lancashire, England) gelöst in NaCl 0,9% in einem Volumen von ebenfalls 250 μ l/100g KG i.p. injiziert. Die Operationsprozedur und Dauer bis zum Wundverschluss blieb unverändert.

Bei den Sham-Tieren wurde eine Scheinoperation durchgeführt, die sich von der Induktionsoperation nur in sofern unterschied, dass lediglich auf das Clamping der Aa renales verzichtet wurde. Auch bei der Shamgruppe wurde 250 μ l/100g KG NaCl 0,9% beziehungsweise SnMP in analoger Konzentration wie bei der entsprechenden Clampinggruppe appliziert.

Mit Erreichen der Ischämiezeit von 45 Minuten wurden beide Klemmen entfernt und die Wunden zuerst mit einer Muskelnahrt (Kürschnernahrt) und anschließend einer Hautnahrt in Knüpftechnik verschlossen. Die Nahtwunden wurden mit Braunol desinfiziert und mit Kompressen abgedeckt.

Während der Aufwachphase wurde jedem Tier 200 μ g/100g KG Tramal (Grünenthal GmbH, Aachen) als Schmerzprophylaxe und 250 μ l/100g KG NaCl 0,9% subkutan gespritzt, um eine postoperative Exikose in der Aufwachphase zu vermeiden.

Auch in der Aufwachphase wurde das Tier in einer ca. 37°C warmen Umgebung gelagert, um eine Hypothermie auszuschließen.

2.4 Entnahmeoperation

Ziel der Entnahmeoperation war die Gewinnung von Urin und Serum zur Bestimmung von Nierenfunktionsparametern, Inflammationswerten und Daten der klinischen Chemie aus dem Serum.

Im Rahmen der Entnahmeoperation wurde das Tier gewogen, analog zur Voroperation narkotisiert und anschließend in Rückenlage auf einer Wärmeplatte fixiert.

Ein Hautschnitt erfolgte distal des Leistenbandes, so dass der Gefäß-Nervenstrang sondiert und anschließend die Leistengefäße (A. und V. inguinalis) freigelegt werden konnten. Kleinere Venen wurden ligiert oder koaguliert.

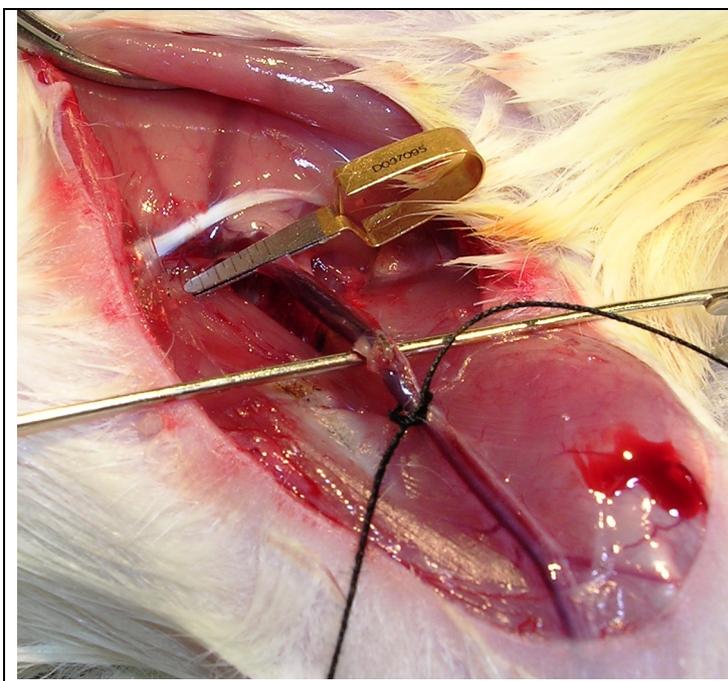


Abb. 5. Darstellung und Vorbereitung der V. inguinalis für die Punktion mit dem Katheter.

Danach wurde die V. inguinalis eröffnet und ein vorher heparinisierte (Liquimin N25000 Hoffmann La- Roche AG, Deutschland) Katheter (Polyethylen, 1mm Außendurchmesser) eingebracht und fixiert.

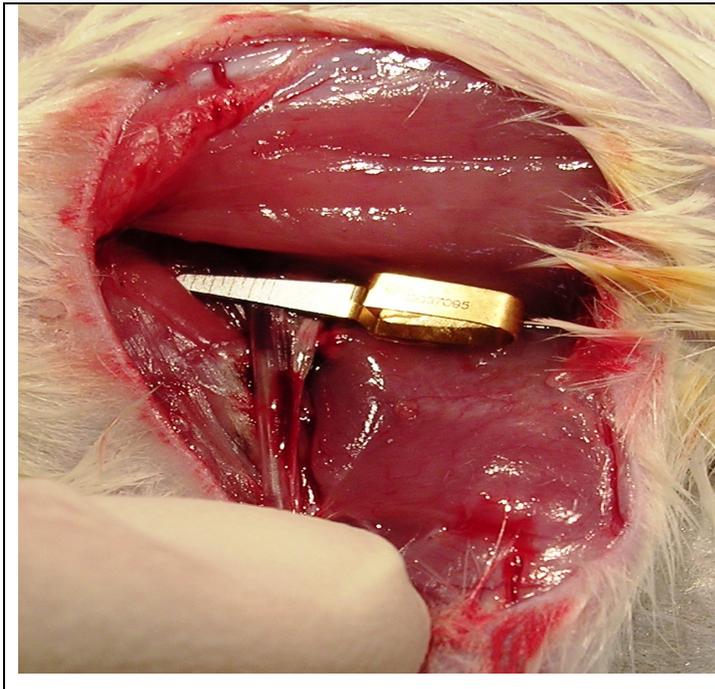


Abb. 6. Punktion mit dem Katheter.

Nach einmaliger Bolusgabe von 0,15ml/100g KG einer PAH-Inulin-Infusion (0,4mg PAH und 2,4mg Inulin in 1ml NaCl) wurde anschließend die Infusion in einem Applikationsvolumen von 0,12ml/min über den Perfusor (Braun Melsung AG Deutschland) infundiert.

Nach Infusionsstart wurde durch einen ca. 1 cm langen Medianschnitt proximal der Symphyse die Harnblase freigelegt, in einer befeuchteten Kompresse extraperitoneal gelagert und mit einem ca. 2 mm langen Schnitt eröffnet. Anschließend wurde ein Urinkatheter in der Harnblase fixiert. Nach 30 minütiger Infusionsdauer wurde mit Erreichen der Äquilibrationsphase eine Meßpipette an den Blasenkatheeter angeschlossen. Nach einer Meßzeit von 20 min wurde das Urinvolumen bestimmt, der Urin in ein Reagenzglas gefüllt und anschließend umgehend zentrifugiert, um gegebenenfalls noch aus der Blasenöffnung resultierende Blutzellen oder Detritus zu eliminieren. Daraufhin erfolgte die Applikation der finalisierenden Analgo-Sedierungs-dosis.

Danach wurde das Abdomen im erweiterten Medianschnitt von der Symphyse bis zum Epigastrium eröffnet und die Aorta abdominalis freipräpariert. Diese wurde nun punktiert, das Blut in einem vorher heparinisierten Glasröhrchen gesammelt und umgehend zentrifugiert (10 min bei 4000 U/min 5°C Megafuge 1.OR, Firma Heraeus, Osterode, Deutschland), um die Blutzellen vom Blutplasma zu trennen. Das Serum

wurde nach dem Zentrifugieren abepittiert und zusammen mit dem Urin bei einer Temperatur von -20°C bis zur weiteren Verarbeitung eingefroren.

2.5 Inulin-Messung

Die Clearance ist definiert als Plasmavolumen, das pro Minute von einer Substanz vollständig befreit wird. Inulin ist ein disperses Polymer der Fruktose mit einem Molekulargewicht von 5 kD, das einen konstanten Plasmaspiegel aufweist, frei filtriert und weder resorbiert, sezerniert noch metabolisiert wird.

Daher entspricht die Inulin-Clearance weitgehend der glomerulären Filtrationsrate (GFR) und stellt ein etabliertes invasives Meßverfahren zur Bestimmung der Nierenfunktion dar.

Die Inulin-Clearance errechnet sich aus

$$\text{Inulin-Clearance} = \frac{c(\text{Urin Inulin}) V}{c(\text{Plasma Inulin}) t}$$

$c(\text{Urin Inulin})$ = Inulinkonzentration im Urin

$c(\text{Plasma Inulin})$ = Inulinkonzentration im Plasma

V = Harnvolumen

t = Zeit

Die GFR ist Ausdruck der kumulativen Filtrationsleistung aller Nephrone der Niere.

Um die Inulinkonzentrationen im Urin und Serum zu bestimmen, wurde jede Einzelprobe 1:500 in Meßpuffer (TES 1,15g, MES 1,0g, 1lAqua dest., 1N Natronlauge, pH 7,4) verdünnt und am Fluoreszenz-Photometer (Victor² 1420 Multilabel counter, Wallac Oy, 20101 Turku, Finnland) mit einer Wellenlänge von 480nm angeregt. Die gemessene Emissionswellenlänge betrug 520 nm.

Da die Emission direkt proportional zur Inulinkonzentration ist, konnte man aus der Emission mittels eines Standards die Inulinkonzentration berechnen.

2.6 Para-Aminohippurat-Messung

Da para-Aminohippurat (PAH) von der Niere frei filtriert und in einem sehr hohen Prozentsatz sezerniert wird, entspricht die mit dem Urin ausgeschiedene PAH-Menge näherungsweise der auf arterieller Seite beider Nieren angebotenen PAH-Menge.

Daraus ergibt sich, dass die PAH-Clearance bei uneingeschränkter Nierenfunktion in Annäherung dem renalen Plasmafluss gleichgesetzt werden darf.

Die PAH-Clearance errechnet sich aus:

$$\text{PAH-Clearance} = \frac{c(\text{PAH Urin}) V}{c(\text{PAH Plasma}) t}$$

$c(\text{PAH Urin})$ = PAH-Konzentration im Urin

$c(\text{PAH Plasma})$ = PAH-Konzentration im Plasma

V = Harnvolumen

t = Zeit

Um die Konzentrationen von PAH im Urin und Serum zu bestimmen, wurden die durch Perchlorsäure denaturierten Proben in mehreren Schritten nach der modifizierten Anthron-Methode mit Azokopplung zu einem stabilen Azofarbstoff verarbeitet.

Dabei bildete die Kupplungsreagenz mit dem farblosen PAH einen violetten Komplex, der im Photometer (MRX Dynatech Deutschland GmbH, Deulendorf, Germany) bei einer Wellenlänge von 550 nm gemessen werden konnte. Die Farbintensität des violetten Komplexes war Ausdruck der PAH-Konzentration.

Wie schon bei der Inulinmessung wurde auch bei der PAH-Messung eine normierte Standardreihe zur Mengen- und Konzentrationsbestimmung verwendet.

2.7 PAH-Nettosekretion

Um die möglichst genaue Konzentration des rein im proximalen Tubulus sezernierten Anteils PAH zu bestimmen kann man die PAH-Nettosekretion berechnen. Dabei wird der im Glomerulum frei filtrierte Anteil der der PAH-Clearance durch Subtraktion der Inulin-Clearance herausgerechnet, und so die tubuläre Sekretion näherungsweise bestimmt.

$$\text{PAH-Nettosekretion} = (c(\text{PAH Urin}) V) / t / (\text{GFR} * c(\text{PAH Plasma}))$$

2.8 Substanzliste für die Inulin- und PAH-Bestimmung

Die Substanzen TES = N-tris(Hydroxymethyl)methyl-2-aminoethanesulfon-Säure, MES = 2-(N-Morpholino)ethanesulfon-Säure wurden bei Sigma-Aldrich Deutschland bestellt. Natronlauge 1N, Perchlorsäure 0,33M, Natriumnitrit-Lösung 1mg/ml, Ammoniumamidosulfat-Lösung 5mg/ml, Salzsäure 32%, N-(1-Naphtyl)äthylen-diammoniumdichlorid und Äthanol abs. wurden von der Firma Merck Deutschland bezogen.

2.9 Bestimmung von Serum-Parametern in der klinischen Chemie (Zentrallabor der Universitätsklinik Würzburg)

Im Zentrallabor der Universitätsklinik Würzburg wurden Creatinin, Harnstoff, Bilirubin und CRP mittels eines Auto-Analysers COBAS INTEGRA 800 (Roche Diagnostics GmbH Mannheim, Deutschland) gemessen.

Das Serum-Creatinin reagiert dabei in alkalischer Lösung mit Pikrinsäure und bildet ein gelbrotes Addukt. Die Farbintensität ist direkt proportional zur Creatininkonzentration und wird bei 512nm photometrisch gemessen.

Harnstoff wird durch Urease zu Ammonium und Carbonat umgewandelt. Das Ammonium wird in einer zweiten Reaktion zusammen mit 2-Oxoglutarat durch die Glutamatdehydrogenase und NADH zu L-Glutamat. Dabei wird pro hydrolysiertem

Mol Harnstoff zwei Mol NADH zu NAD oxidiert. Die Geschwindigkeit der NADH-Abnahme ist direkt proportional zur Harnstoffkonzentration.

Bilirubin wird durch die Diazo-Methode zu Azobilirubin umgewandelt. Die Extinktionszunahme wird bei 552nm photometrisch gemessen.

Das CRP agglutiniert mit Latexpartikeln, die mit Anti-CRP-Antikörpern beschichtet sind. Der Niederschlag wird turbidimetrisch bei 552nm bestimmt.

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 Excel (Microsoft Corporation, Germany).

Das Signifikanzniveau wurde nach den allgemein üblichen Werten festgelegt.

$p < 0,05$ = signifikant (*) und $p > 0,05$ = nicht signifikant.

3 Ergebnisse

3.1 Der Einfluß von SnMP auf das Serum-Creatinin im Verlauf des akuten Nierenversagens

Das Serum-Creatinin ist ein einfach zu bestimmender Marker für die glomeruläre Filtration und findet im klinischen Alltag einen breiten Einsatz zur Abschätzung der Nierenfunktion. Es wird, ähnlich wie Inulin, frei filtriert und nur zu einem vernachlässigbaren Anteil sezerniert.

Das Serum-Creatinin stellt jedoch einen deutlich störanfälligen Messwert für die Beschreibung der Nierenfunktion dar, da Creatinin vom Muskel in dessen Stoffwechsel freigesetzt wird und damit neben der renalen Exkretion auch von der Muskelmasse, dem Alter, der körperlichen Aktivität und noch vielen anderen Einflussgrößen abhängig ist.

Die Nativ-Tiere (Tag 0) hatten einen durchschnittlichen Serum-Creatininwert von 0,28 mg/dl und lagen damit im Bereich des Normwertes (0-0,88 mg/dl).

Am ersten postoperativen Tag kam es bei den Clamping+NaCl-Tieren zu einem Anstieg des Serum-Creatinins um 400 % auf 1,12 mg/dl. Im Verlauf sank das Serum-Creatinin und schon am dritten Tag normalisierten sich die Werte wieder (0,4 mg/dl) und blieben auch im weiteren Beobachtungszeitraum im Normbereich. Es blieb aber ein signifikant höherer Serum-Creatininwert im Vergleich zu den Serum-Creatininwerten der Nativ-Tiere (Tag 0).

Die Clamping+SnMP-Tiere stiegen mit dem Serum-Creatininwert am ersten Tag um 485 % auf 1,36 mg/dl. Dieser Anstieg war damit deutlich stärker, aber nicht signifikant, verglichen mit den Werten der Clamping+NaCl-Tieren.

Auch bei den Clamping+SnMP-Tieren fielen die Serum-Creatininwerte am dritten postoperativen Tag auf Normwerte ab (0,37 mg/dl). Trotzdem lag er noch signifikant höher als der Wert der Nativ-Tiere (Tag 0), und zeigte im Verlauf keine auffällige Schwankungen mehr.

Die Sham+SnMP-Gruppe blieb, vom Ausgangswert ausgehend, nahezu konstant über den gesamten postoperativen Verlauf (Abb.7). Daraus könnte man schließen, dass die Blockade der HO-1 sich am ersten Tag negativ auf das akute Nierenversagen auswirkt,

aber schon nach drei Tagen der Effekt durch eine Creatinin-Meßung nicht mehr nachzuweisen ist.

Bei der Sham-Gruppe und damit bei der intakten Niere scheinen die Applikation von SnMP und der Operationsstress keinen Einfluss auf die Creatinin-Retention und Exkretion zu nehmen. (Abb.1)

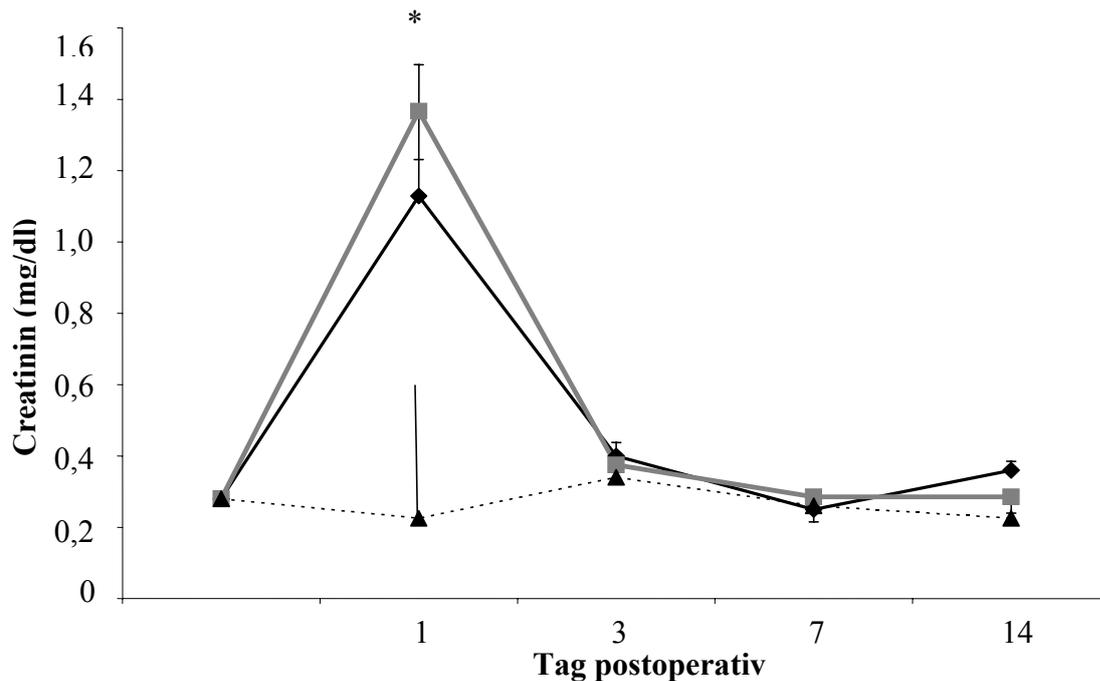


Abb.7: Liniendiagramm der Serum-Creatininkonzentrationen im Vergleich der Clamping+NaCl-Gruppe (schwarze durchgezogene Linie) mit der Clamping+SnMP-Gruppe (graue durchgezogene Linie) und der Sham+SnMP-Gruppe (graue gestrichelte Linie) in Abhängigkeit vom postoperativen Verlauf. * = $p < 0,05$

3.2 Der Effekt von SnMP auf den Serum-Harnstoff im Verlauf des akuten Nierenversagens

Der Serum-Harnstoff zählt wie Serum-Creatinin zu den Retentionswerten und damit zu den Parametern zur Abschätzung der Nierenfunktion im klinischen Alltag. Harnstoff ist das Endprodukt des humanen Eiweißstoffwechsels. Seine Konzentration im Serum

hängt von verschiedenen den Eiweißkatabolismus beeinflussenden Faktoren, wie zum Beispiel Eiweißzufuhr, Fieber, Kachexie und vielen anderen ab.

Die Serum-Harnstoff-Konzentration überschreitet erst bei einem Absinken des Glomerulumfiltrates unter 25 % die obere Normgrenze.

Der Ausgangswert der Nativ-Tiere (Tag 0) lag mit 30,9 mg/dl im Normbereich (10-50 mg/dl).

Ähnlich wie beim Serum-Creatinin stieg die Serum-Harnstoffkonzentration der Clamping+NaCl-Gruppe auf 164,5 mg/dl und damit deutlich über den Normwert an. Aber bereits am dritten postoperativen Tag lag die Clamping+NaCl-Gruppe mit 54,2 mg/dl nur knapp über dem Normwert, um am siebten und vierzehnten Tag diesen wieder zu unterschreiten.

Analog dazu verhielt sich auch die Clamping+SnMP-Gruppe. Allerdings kam es am ersten Tag zu einem massiveren Anstieg der Serum-Harnstoffwerte auf 217,9 mg/dl, der mit $p = 0,07$ gerade nicht mehr signifikant ist im Vergleich zur Clamping+NaCl-Gruppe.

Auch bei den Clamping+SnMP-Tieren sanken die Werte am dritten postoperativen Tag und lagen mit 48,2 mg/dl wieder im Normbereich. Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zur Clamping+NaCl-Gruppe.

Die Sham+SnMP-Tiere zeigten nur minimale Schwankungen im Verlauf, ausgehend von den Nativ-Tieren (Tag 0), die allerdings nie signifikant waren.

Der Verlauf der Serum-Harnstoffkinetik beschreibt ebenfalls ein schlechteres Outcome der Clamping+SnMP-Gruppe am ersten Tag. Auch hier zeigt sich, dass der Effekt ab dem dritten Tag nicht mehr nachvollziehbar ist, und dass SnMP und der Operationsstress bei der intakten Niere (Sham+SnMP-Gruppe) keinen Einfluss auf die Serum-Harnstoffwerte zu haben scheinen. (Abb.8)

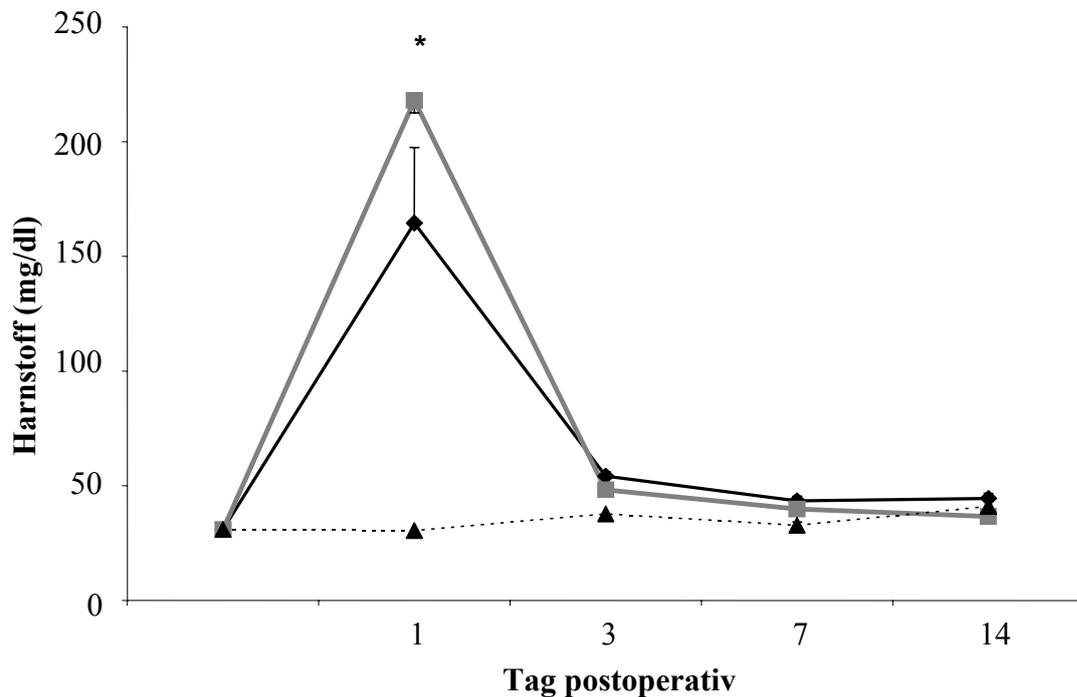


Abb.8: Liniendiagramm der Serum-Harnstoffkonzentration im Vergleich der Clamping+NaCl-Gruppe (schwarze durchgezogene Linie) mit der Clamping+SnMP-Gruppe (graue durchgezogene Linie) und der Sham+SnMP-Gruppe (schwarze gestrichelte Linie) während des postoperativen Zeitverlaufs. * = $p < 0,05$

3.3 Der Einfluss von SnMP auf die Inulin-Clearance im Verlauf des akuten Nierenversagens

Die Inulin-Clearance stellt ein sehr exaktes, etabliertes invasives Meßverfahren zur Bestimmung der glomerulären Filtrationsrate und damit der Nierenfunktion dar.

Die Nativ-Tiere (Tag 0) hatten eine Inulin-Clearance von 0,81 ml/min/kg KG. Von diesem Wert ausgehend sank die Clearance bei den Clamping+NaCl-Tieren am ersten postoperativen Tag auf 20,4 % des Ausgangswertes ab. Im weiteren Verlauf zeigte sich eine kontinuierliche Verbesserung der Clearance bis zum vierzehnten postoperativen Tag auf 55,2 % des Ausgangswertes.

Am ersten postoperativen Tag zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen den Clamping+SnMP-Tieren und den Clamping+NaCl-Tieren bei der Reduktion der Clearance. Von den Nativ-Tieren (Tag 0) ausgehend sank der Wert auf 7,5 % des Ausgangswertes.

Interessanterweise kam es in der Clamping+SnMP-Gruppe am dritten Tag zu einer deutlicheren Verbesserung der Clearance auf 32,4 % des Ausgangswertes. Im Vergleich dazu stieg die Clearance der Clamping+NaCl-Gruppe nur auf 25,9 % des Startlevels. Die Differenz ließ sich jedoch nicht als signifikant darstellen. Am siebten und vierzehnten Tag zeigten sich bei beiden Gruppen keine Differenzen in der Inulin-Clearance.

Der deutliche Abfall beider Gruppen am ersten Tag zeigt, dass es zu einem akuten Nierenversagen mit Einschränkung der glomerulären Filtrationsrate gekommen ist. Die signifikant schlechtere Clearance der Clamping+SnMP-Gruppe verdeutlicht, dass die Hemmung der HO-1 sich nachteilig auf die Nierenfunktion auswirkt. Gleichzeitig ergibt sich ein Trend, dass dieser Effekt bereits nach drei Tagen nicht mehr funktionell nachzuweisen ist (Abb.9).

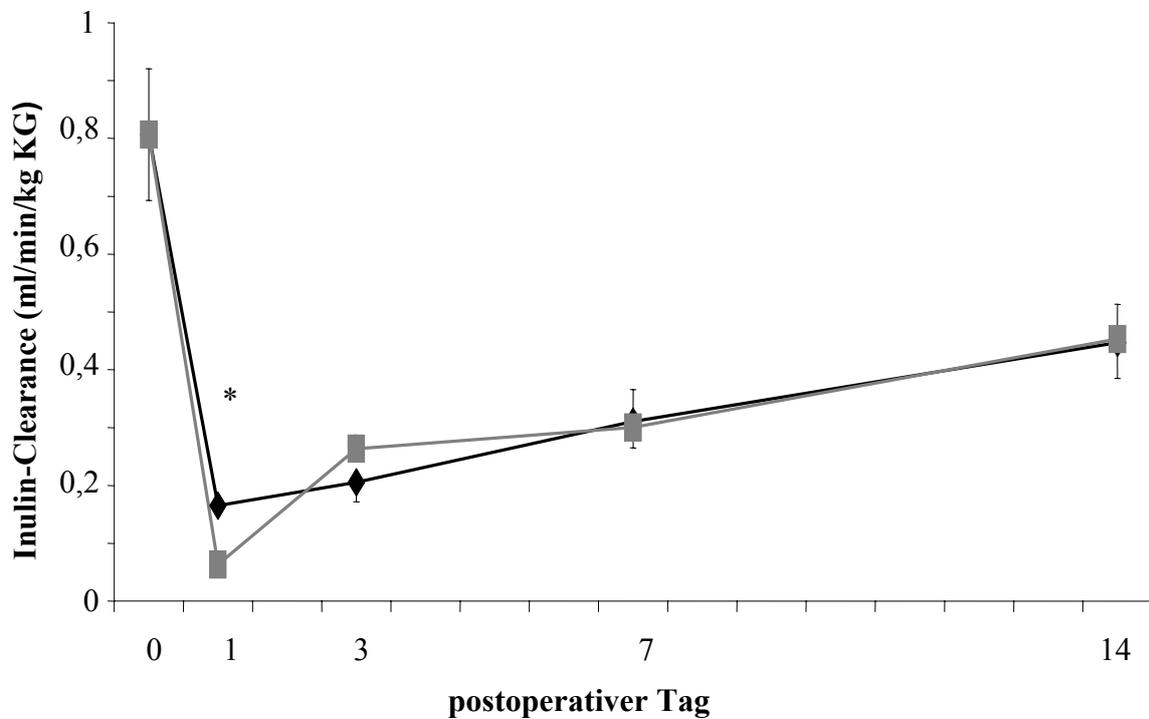


Abb.9: Liniendiagramm der Inulin-Clearance im Vergleich der Clamping+NaCl-Gruppen (schwarze Linie) mit der Clamping+SnMP-Gruppe (graue Linie) während des postoperativen Zeitverlaufs. * = $p < 0,05$

3.4 Der Effekt von SnMP auf die PAH-Clearance im Verlauf des akuten Nierenversagens

Als Schätzwert für den renalen Plasmafluß spielt die PAH-Clearance eine wichtige Rolle. Da PAH von den Nieren frei filtriert und auch in einem sehr hohen Prozentsatz

sezerniert wird ergibt sich, dass die PAH-Clearance unter physiologischen Bedingungen in Annäherung dem renalen Plasmafluss entspricht.

Die PAH-Clearance bei den Nativ-Tieren (Tag 0) betrug 2,61 ml/min/kg KG. Ebenso wie bei der Inulin-Clearance sank die PAH-Clearance der Clamping+NaCl-Gruppe deutlich auf 32,5 % des Ausgangswertes. Im weiteren postoperativen Verlauf zeigte sich eine kontinuierliche Verbesserung der PAH-Clearance auf 60,9 % des Startlevels am vierzehnten postoperativen Tag. Auch bei den Clamping+SnMP-Tieren kam es am ersten Tag zu einem Abfall der PAH-Clearance auf 14,5 % des von den Nativ-Tieren (Tag 0) vorgegebenen Ausgangswertes, der damit signifikant niedriger ausfiel als bei der Clamping+NaCl-Gruppe.

Interessanterweise verbesserte sich auch die PAH-Clearance der Clamping+SnMP-Gruppe am dritten postoperativen Tag bereits wieder auf 44,1 % des Ausgangswertes und damit schneller als die Clamping+NaCl-Gruppe, die bei 37,9 % lag. Die Differenz zwischen den Gruppen am dritten Tag ist mit $p = 0,155$ nicht signifikant.

Im weitem Beobachtungszeitraum stieg die Clearance der Clamping+SnMP-Gruppe ohne signifikanten Unterschied nahezu identisch mit der Clamping+NaCl-Gruppe auf schließlich 55,1 % des Ausgangswertes.

Die deutliche Verschlechterung der Clearance am ersten Tag mit dem signifikanten Unterschied zwischen beiden Gruppen zeigt, dass die Blockierung von HO-1 durch SnMP sich nachteilig auf die PAH-Clearance auswirkt. Analog zur Inulin-Clearance ergibt sich der Trend zur Überkorrektur am dritten postoperativen Tag. Für die Clamping+SnMP-Gruppe zeigt sich eine leichte Verbesserung der PAH-Clearance, die sich im weiteren Verlauf nicht mehr funktionell auswirkt (Abb.10).

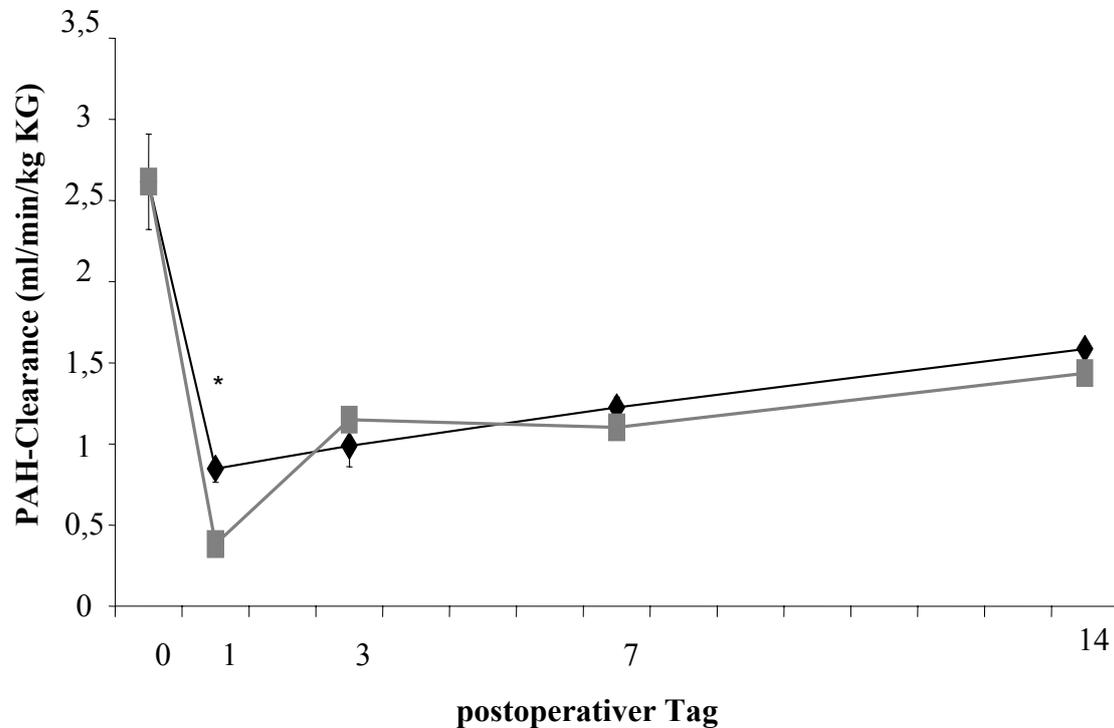


Abb.10: Liniendiagramm der PAH-Clearance im Vergleich der Clamping+NaCl-Gruppe (schwarze Linie) mit der Clamping+SnMP-Gruppe (graue Linie) während des postoperativen Zeitverlaufs. * = $p < 0,05$

3.5 Die Wirkung von SnMP auf die Sham-Tiere im Verlauf des akuten Nierenversagens

Um einen Effekt von SnMP und der Operation auf die intakte Niere auszuschließen beziehungsweise zu dokumentieren, wurden die Sham+NaCl-Gruppe mit der Sham+SnMP-Gruppe verglichen.

Die Inulin-Clearance der Nativ-Tiere (Tag 0) betrug 0,81 ml/min/kg KG. Bei der Sham+NaCl-Gruppe zeigte sich ein leichter, nicht signifikanter Abfall der Clearance am

ersten Tag auf 81,1 % des Ausgangswertes. Im weiteren Beobachtungszeitraum blieb die Clearance unverändert. Auch bei der Sham+SnMP-Gruppe sank, analog zur Sham+NaCl-Gruppe am ersten postoperativen Tag, die Inulin-Clearance auf 84,6 %. Im weiteren Verlauf zeigten sich keine signifikanten Differenzen zwischen den Sham-Gruppen, so dass man davon ausgehen kann, dass SnMP auf die gesunde Niere keine Auswirkungen bezüglich einer Alteration der Clearancefunktion von Inulin hat (Abb.11).

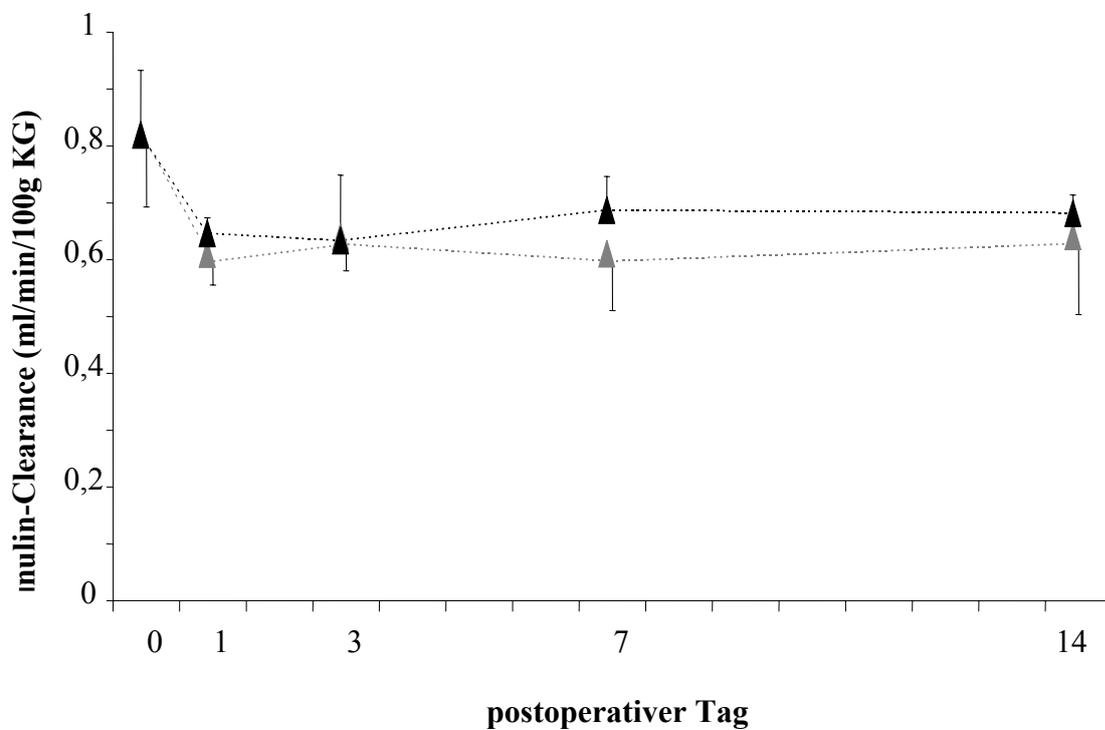


Abb.11: Liniendiagramm der Inulin-Clearance im Vergleich der Sham+NaCl-Gruppe (graue Linie) mit der Sham+SnMP-Gruppe (schwarze Linie) während des postoperativen Verlaufs. * = $p < 0,05$

Bei der Sham+NaCl-Gruppe zeigte sich in der PAH-Clearance analog zur Inulin-Clearance ein Abfall am ersten postoperativen Tag im Vergleich zu den Nativ-Tieren

(Tag 0), der allerdings nicht signifikant war. Im weiteren Verlauf blieb die Clearance auf dem Niveau des ersten Tages konstant mit leichter Verbesserung am vierzehnten Tag.

Die Sham+SnMP-Gruppe verbesserte die PAH-Clearance am ersten Tag von 2,6 ml/min/kg KG auf 2,8 ml/min/kg KG ohne signifikanten Unterschied zu den Nativ-Tieren (Tag 0). Die Differenz zu der Sham+NaCl-Gruppe war hingegen am ersten postoperativen Tag signifikant.

Am dritten Tag sank die Clearance der Sham+SnMP-Gruppe anschließend auf vergleichbare Clearancewerte der Sham+NaCl-Gruppe. Im weiteren Beobachtungszeitraum zeigten sich keine signifikanten Differenzen mehr zwischen den Gruppen. Insgesamt scheint SnMP aber keinen Einfluß auf die Funktion der gesunden Niere zu haben (Abb.12).

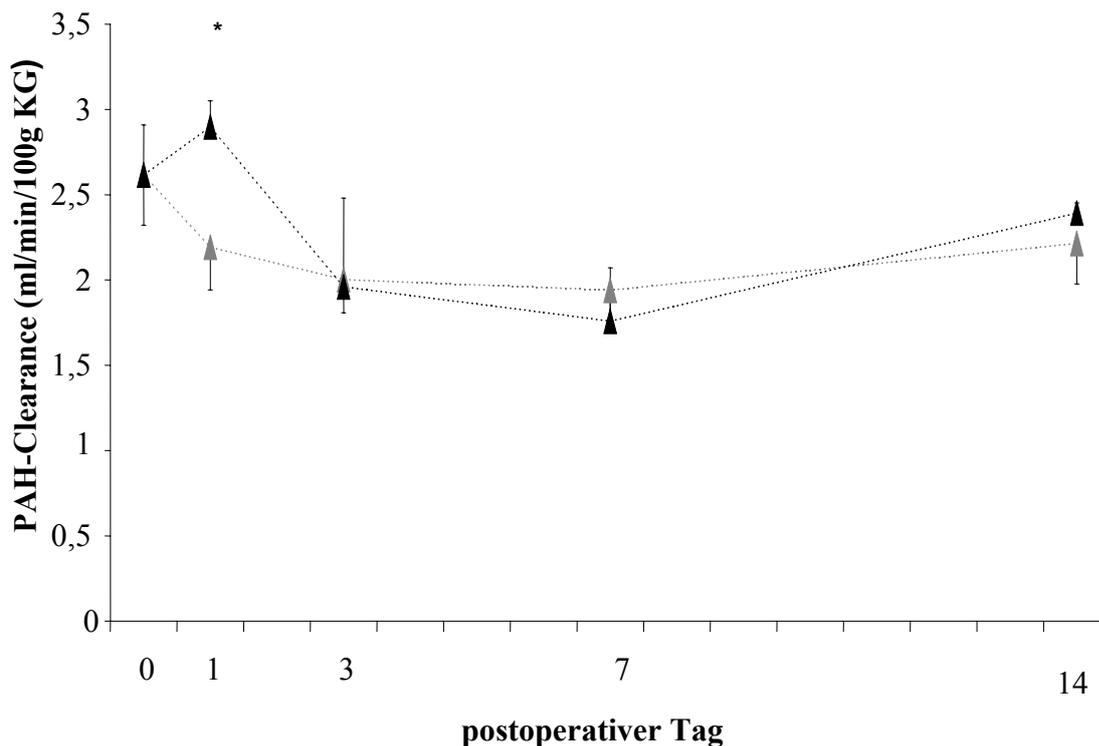


Abb.12: Liniendiagramm der PAH-Clearance im Vergleich der Sham+NaCl-Gruppe (graue Linie) mit der Sham+SnMP-Gruppe (schwarze Linie) während des postoperativen Verlaufs. * = $p < 0,05$

3.6 Der Einfluss von SnMP auf die PAH-Nettosekretion im Verlauf des akuten Nierenversagens

Subtrahiert man die Inulin-Clearance von der PAH-Clearance so lässt sich die PAH-Nettosekretion errechnen. Sie zeigt die reine PAH-Sekretionsleistung der Niere an und ist damit ein indirekter Marker für die tubuläre Exkretionsfunktion.

Da aus den Ergebnissen der Clearance von Inulin und PAH abzulesen ist, dass sich am ersten postoperativen Tag in allen Messdaten eine signifikante Abnahme der Nierenfunktion bei der Clamping+NaCl-Gruppe und im Vergleich zu dieser eine ebenfalls signifikante weitere Verschlechterung der Werte bei der Clamping+SnMP-Gruppe stattfand, wurde in diesem Zeitraum die Sekretionsleistung bestimmt. Da sich der Trend durchzusetzen scheint, dass sich die Clamping+SnMP-Gruppe am dritten postoperativen Tag minimal besser erholt, als die Clamping+NaCl-Gruppe wurde auch für diesen Tag die Sekretionsleistung bestimmt.

Die Nativ-Tiere (Tag 0) hatten am Tag 1 eine PAH-Nettosekretion von 3,5 ml/min. Bei der Clamping+NaCl-Gruppe fiel die Sekretion auf 38 % des Ausgangswertes. Analog zu den vorherigen Ergebnissen sank die Sekretionsleistung der Clamping+SnMP-Tiere mit 17,4% des Startlevels noch deutlich unter die Werte der Clamping+NaCl-Gruppe. Die Differenz zwischen den Clamping-Gruppen ist mit $p = 0,07$ gerade nicht mehr signifikant.

Die Sham+NaCl-Tiere zeigten, im Vergleich zu den Nativ-Tieren (Tag 0) nur eine geringe, nicht signifikante Einschränkung (Abb.5).

Die PAH-Nettosekretions-Ergebnisse bestätigen den Verlust der tubulären Sekretion der Niere nach einem akuten Nierenversagen, wobei sich die Blockade der HO-1 auch negativ auf die Sekretionsleistung des proximalen Tubulus auszuwirken scheint. (Abb.13)

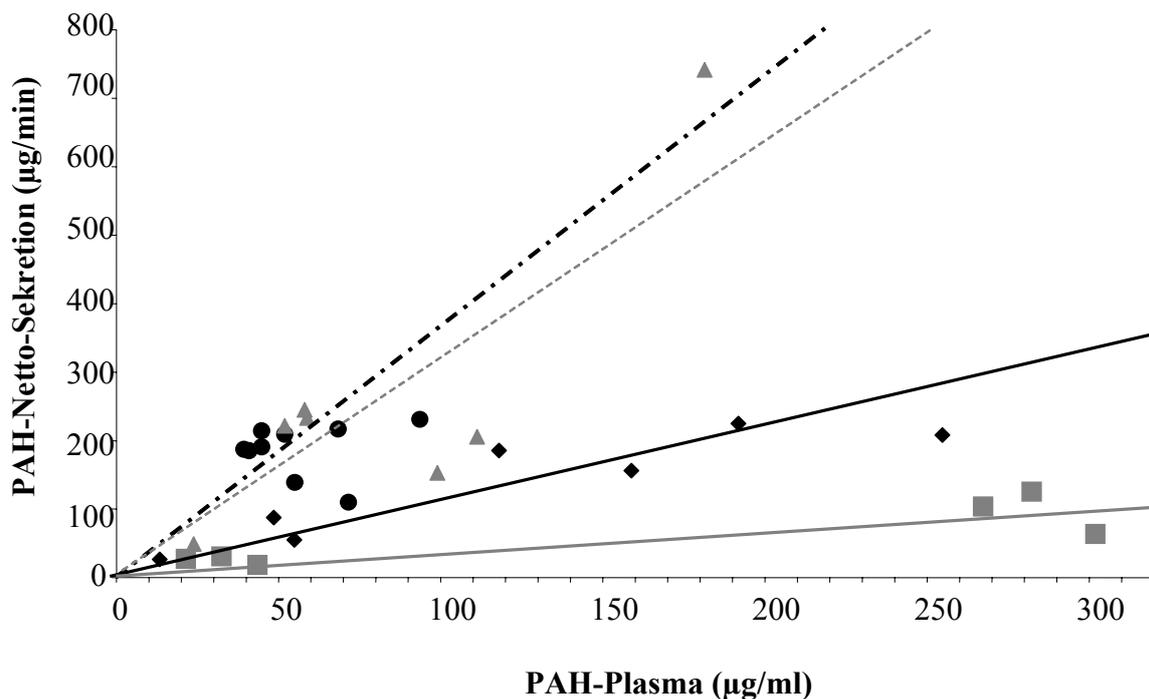


Abb.13: Punktverteilung mit Anlage einer Ausgleichsgeraden der PAH-Nettosekretion als Vergleich zwischen den nativ Tieren (schwarze Kreise, schwarz gestrichelte Linie), den Clamping+NaCl-Tieren (schwarze Rechtecke, schwarze durchgezogene Linie), der Clamping+SnMP-Gruppe (graue Vierecke; graue durchgezogene Linie) und der Sham+NaCl-Gruppe (graue Dreiecke, graue gestrichelte Linie) am ersten postoperativen Tag.

Um die Veränderung der Sekretionsleistung im Verlauf zu dokumentieren und aufgrund der auffälligen Dynamik der PAH- und Inulin-Clearance-Ergebnisse wurde die PAH-Nettosekretion ebenfalls für den dritten postoperativen Tag berechnet. Dabei zeigte sich im Vergleich zum Tag 1 ein Anstieg der Sekretion der Clamping+NaCl-Gruppe auf 42,8 % der Sekretionsleistung der Nativ-Tiere (Tag 0).

Auch die Clamping+SnMP-Gruppe verbesserte sich deutlich und kam wie die Clamping+NaCl-Gruppe auf 42,8 % des Ausgangswertes der Nativ-Tiere (Tag 0).

Es zeigte sich, dass die Sekretionsleistung der Sham+NaCl-Gruppe am dritten Tag im Vergleich zu den Nativ-Tieren (Tag 0) auf 74,6 % rückläufig ist.

Auch bei der PAH-Nettosekretion zeigte sich, dass es am dritten postoperativen Tag vor allem bei der Clamping+SnMP-Gruppe zu einer Filtrationsverbesserung der Nieren kam und gleichzeitig der Effekt des SnMP funktionell aufgehoben scheint. (Abb.14)

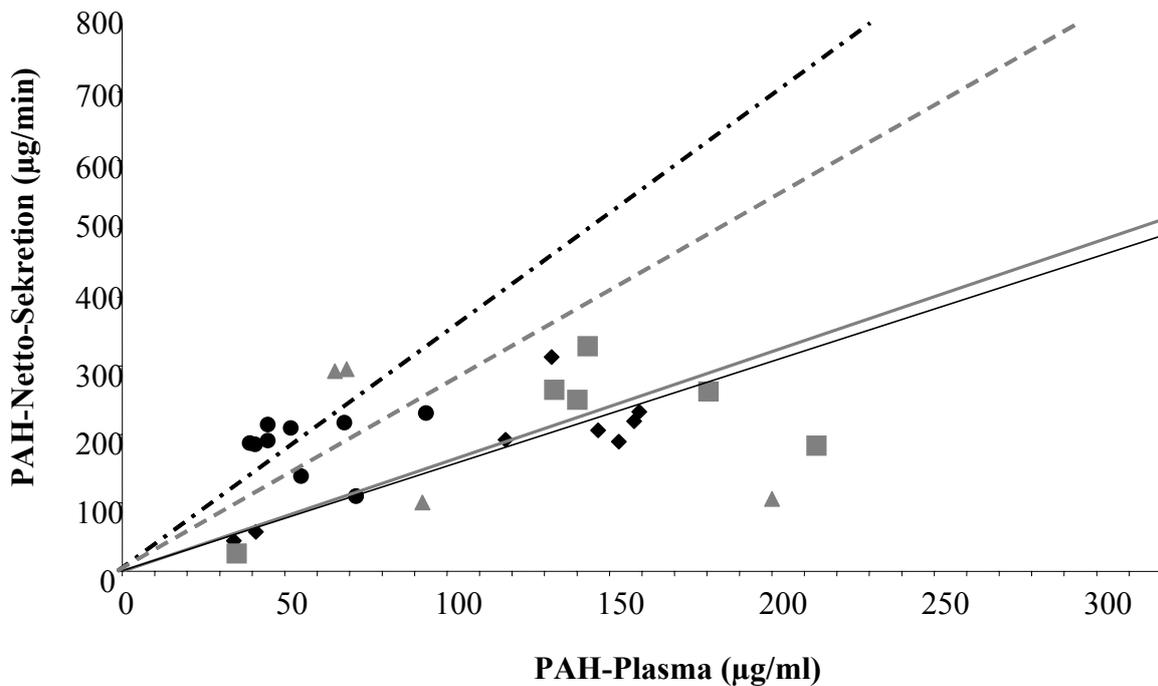


Abb.14: Punktverteilung mit Anlage einer Ausgleichsgeraden der PAH-Nettosekretion zum Vergleich zwischen den Nativ-Tieren (schwarze Kreise, schwarze gestrichelte Linie), den Clamping+NaCl-Tieren (schwarze Rechtecke, schwarze durchgezogene Linie), den Clamping+SnMP-Tieren (graue Vierecke, graue durchgezogene Linie) und den Sham+NaCl-Tieren (graue Dreiecke, graue gestrichelte Linie) am dritten postoperativen Tag.

3.7 Der Einfluss von SnMP auf das Serum-Bilirubin im Verlauf des akuten Nierenversagens

Die Hämoxxygenase-1 (HO-1) ist das geschwindigkeitslimitierende Enzym beim Abbau von Häm zu seinen Stoffwechselendprodukten. Wie bereits erwähnt wird Häm durch

die HO-1 zu Biliverdin abgebaut und im finalen Schritt durch die Biliverdin-Reduktase zu Bilirubin verstoffwechselt, das biliär ausgeschieden wird. Deshalb und aufgrund der Zytotoxizität in erhöhten Konzentrationen ist es von Interesse, den Verlauf des Bilirubins im Beobachtungszeitraum zu verfolgen.

Der Bilirubinwert der Nativ-Tiere (Tag 0) lag mit 0,33 mg/dl deutlich unter dem für den Menschen festgelegten Normwert von 2-6 mg/dl. Normwerte der Ratte waren in der Literatur nicht zu eruieren.

Die Clamping+NaCl-Gruppe zeigte am ersten und dritten Tag keine Veränderungen gegenüber dem Ausgangswert. Am Tag sieben stieg die Bilirubinkonzentration auf 0,42 mg/dl an, um dann am vierzehnten Tag auf den Ausgangswert abzufallen. Der Anstieg am siebten Tag war nicht signifikant im Vergleich zur Sham+SnMP-Gruppe.

Ähnlich wie die Clamping+NaCl-Gruppe verhielt sich auch die Clamping+SnMP-Gruppe. Ihr Wert sank am ersten Tag auf 0,26 mg/dl ab und stieg am dritten Tag wieder leicht über den Bilirubinwert der Clamping+NaCl-Gruppe. An allen Beobachtungszeitpunkten verlief der Bilirubinstoffwechsel ohne signifikante Differenzen zur Clamping+NaCl-Gruppe.

Die Sham+SnMP-Gruppe zeigte nach initial unveränderten Werten am dritten postoperativen Tag einen leichten Anstieg des Bilirubins auf 0,4 mg/dl, um im weiteren Verlauf wieder auf Werte von 0,27 mg/dl am vierzehnten Tag abzusinken.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass hier keine signifikanten Unterschiede zwischen den Clamping-Gruppen gefunden wurden. (Abb.15)

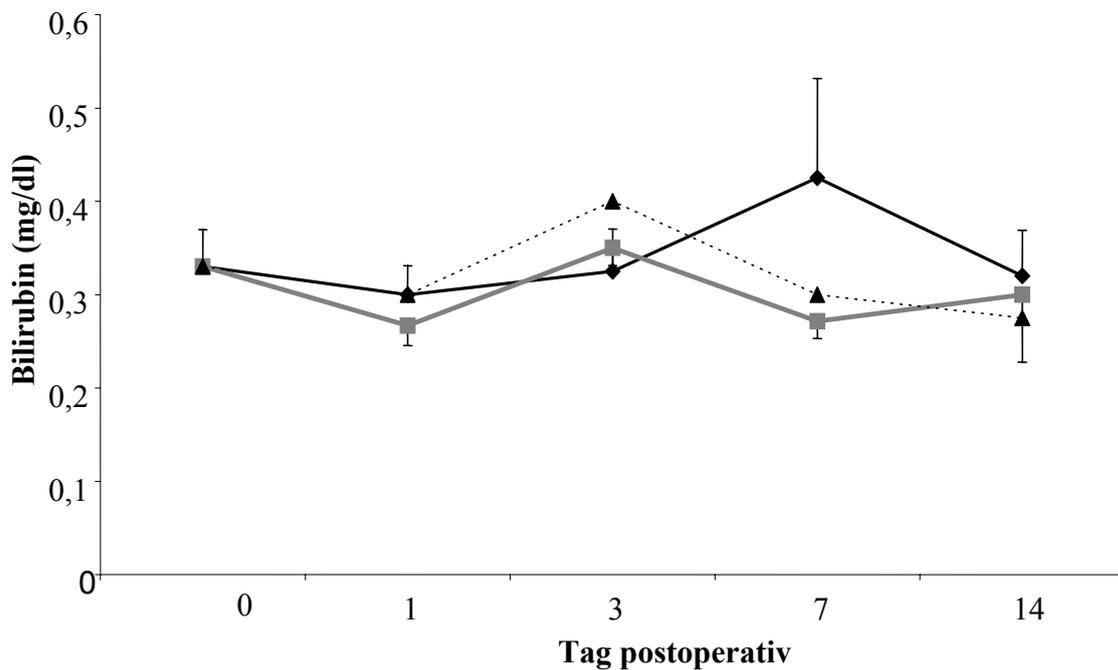


Abb. 15: Liniendiagramm der Bilirubinkonzentration im Vergleich der Clamping+NaCl-Gruppe (schwarze durchgezogene Linie), der Clamping+SnMP-Gruppe (graue durchgezogene Linie) und der Sham+SnMP-Gruppe (schwarze gestrichelte Linie) während des postoperativen Verlaufs.

3.8 Der Effekt von SnMP auf das Serum-CRP im Verlauf des akuten Nierenversagens

Das C-reaktive Protein (CRP) gilt als klassisches Akute-Phase-Protein. Es gibt eine generelle unspezifische Antwort auf entzündliche Prozesse. Da das CRP im Gegensatz zur Blutsenkung von weniger anderen Faktoren abhängig ist und auch schneller am Beginn einer Entzündungsreaktion ansteigt, wurde das CRP als systemischer Entzündungsmarker gewählt.

Wie schon vorher beschrieben wird davon ausgegangen, dass beim akuten Nierenversagen die Inflammation in der Pathogenese eine entscheidende Rolle spielt. Deshalb ist hier das CRP als Entzündungsparameter von Interesse.

Es zeigt aber auch, ob es peri- oder postoperativ zu einer generalisierten Entzündung kommt und damit zur Überprüfung der Sterilität während der Operation.

Sämtliche Meßpunkte des Serum-CRP lagen im unteren Normbereich (0-0,5 mg/dl). Signifikante Unterschiede zwischen den Clamping-Gruppen wurden nicht dokumentiert.

Da alle Veränderungen nur äußerst gering an der unteren Grenze des Normwertes stattfanden, sind diese Schwankungen zu vernachlässigen und es ist davon auszugehen, dass keine Entzündung stattgefunden hat (Abb.16).

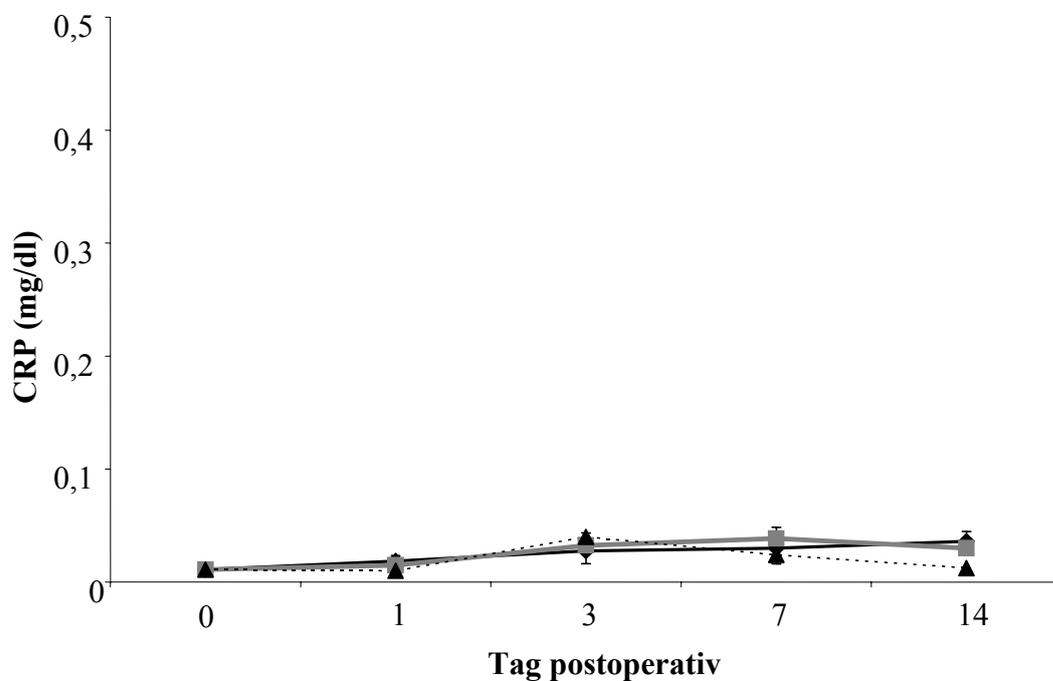


Abb.16: Liniendiagramm zum Vergleich der Serum-CRP-Konzentration zwischen der Clamping+NaCl-Gruppe (schwarze durchgezogene Linie), der Clamping+SnMP-Gruppe (graue durchgezogene Linie) und der Sham+SnMP-Gruppe (schwarze gestrichelte Linie) während des postoperativen Verlaufs.

4. Diskussion

4.1 Methodik

Der Versuchsaufbau gleicht bis auf wenige Änderungen dem von Schneider R. et al (89) verwendeten Modell, um ein definiertes, reproduzierbares akutes ischämisches Nierenversagen herbeizuführen.

Damit handelt es sich um ein etabliertes Verfahren, um in vivo Effekte von Substanzen sowohl auf die ischämische als auch intakte Niere durch viele wichtige klinische Parameter wie Inulin/PAH-Clearance, die Serum-Retentionswerte Creatinin und Harnstoff sowie das im Hämstoffwechsel wichtige Bilirubin und den systemischen Inflammationsmarker CRP über einen Zeitraum von vierzehn Tagen zu untersuchen.

Weil alle Operationen und Auswertungen durch einen Untersucher ausgeführt wurden, können Einflüsse durch personenbedingte Unterschiede im Operationsverfahren ausgeschlossen werden.

Da es sich um einen in vivo Versuch handelt sind allerdings individuelle tierbedingte Einflüsse nicht ganz auszuschließen, weshalb eine entsprechende Fallzahl ($n = 101$) zur Darstellung signifikanter Unterschiede einzusetzen war.

Um dem Problem der peri-und postoperativen Exikkose entgegenzuwirken, wurde während und nach der Induktionsoperation der intraoperative Flüssigkeitsverlust ausgeglichen und das Flüssigkeitsvolumen der Inulin/PAH-Infusion bei der Entnahmeoperation im Vergleich zu dem Versuchsaufbau von Schneider et al (89) nochmals erhöht. Durch die damit erhöhte Diurese wurde die Analytik aufgrund größerer Urinvolumina ebenfalls vereinfacht.

Trotz all dieser Maßnahmen lässt sich der tier-und operationsbedingte Einfluss auf die Ergebnisse nicht ganz ausschließen. Er wurde aber, wie die Ergebnisse der Sham+NaCl-Gruppe zeigen, vernachlässigbar gering gehalten.

Eine generalisierte Entzündung konnte durch die konstant im unteren Normbereich liegenden CRP-Werte ausgeschlossen werden. Dies weist auf die sehr sterilen Bedingungen bei der Operation und Wundbehandlung hin.

Der Serum-Creatininwert allein ist, trotz seines täglichen klinischen Einsatzes zur Diagnostik des akuten Nierenversagens, ein eher suboptimaler Marker, da er von vielen externen Faktoren wie Muskelmasse, Alter, der körperlichen Aktivität und vielen anderen abhängt.

Die Untersuchungen von Moran et al (30) haben gezeigt, dass durch die häufig im Rahmen des akuten Nierenversagens auftretende Flüssigkeitsretention der Serum-Creatininwert verdünnt wird und das Erkennen des ANV hierdurch herausgezögert wird. Außerdem führen große Veränderungen in der glomerulären Filtrationsrate in den ersten Tagen aufgrund von Kumulationseffekten nur zu geringen Veränderungen des Serum-Creatinins. Auch durch den Verlust der Zell-Zell-Kontakte im Tubulussystem der Niere, nach akutem Nierenversagen, kann es außerdem zu einer pathologischen Rückresorption des Creatinins kommen, was zu falschen Creatinin-Clearance-Werten führt.

Um möglichst exakte Werte über die Nierenfunktion zu erhalten, wurde nicht nur der Serum-Creatininwert bestimmt, sondern auch die genauer bestimmbare und weniger störanfällige Inulin-Clearance als Maß der renalen Filtrationsleistung.

Auch die PAH-Clearance als Marker für den renalen Plasmafluss ist im akuten Nierenversagen nur eingeschränkt aussagekräftig.

Die PAH-Clearance setzt sich aus dem frei filtrierte und dem vom Tubulus sekretierten Anteil zusammen. Bei der intakten Niere lässt sich aus beiden Anteilen noch auf den renalen Plasmafluss rückschließen, dies schränkt sich aber mit zunehmender Nierenschädigung und Ausfall des tubulären Transportsystems und der GFR zunehmend ein.

Die PAH-Nettosekretion zeigt somit den Anteil des durch die Tubuli sekretierten PAH an, der mit abnehmender Nierenfunktion immer geringer wird.

4.2 Diskussion der Ergebnisse

Die Ergebnisse der Retentionswerte und der Inulin/PAH-Clearance bei den Clamping+NaCl-Tiere zeigen, dass durch die Induktionsoperation tatsächlich ein reproduzierbares akutes ischämisches Nierenversagen herbeigeführt wurde.

Durch die Sham-Gruppen konnte dargestellt werden, dass weder das Operationsverfahren noch die alleinige SnMP-Substitution den Abfall der Nierenleistung verursachen kann.

4.2.1 Die Retentions- und Clearancewerte

Der Rückgang der Nierenfunktion (Inulin/PAH-Clearance, Serum-Retentionswerte) der Clamping+SnMP-Gruppe am ersten postoperativen Tag fiel signifikant stärker aus im Vergleich zum Leistungsabfall der Clamping+NaCl-Gruppe (siehe Tabelle 7,8,9 und 10). Dies zeigt, dass die Hemmung der Hämoxxygenase durch den nicht-selektiven HO-Inhibitor SnMP zu einer zusätzlichen Verschlechterung der Nierenfunktion beim akuten Nierenversagen führt. Dies führt im Umkehrschluss zur Bestätigung, dass die Hämoxxygenase, wie schon in mehreren Arbeiten vermutet, eine protektive Rolle beim akuten Nierenversagen spielt.

Zu vergleichbaren Ergebnissen kamen auch die Beobachtungen von Shimizu et al (65), die in ihren Versuchen mit SnMP beim akuten ischämischen Nierenversagen die Serum-Creatininwerte über einen postinterventionellen Zeitraum von 24 Stunden beobachtet haben und zeigen konnten, dass die mit SnMP behandelten Tiere deutlich höhere Serum-Creatininwerte hatten als die unbehandelte Vergleichsgruppe. Auch die Arbeitsgruppe um Kaizu et al (87), die anstelle des stärker wirksameren SnMP den Versuch mit SnPP über 24 Stunden durchführten, konnten eine Abnahme der Hämoxxygenaseaktivität in der Niere feststellen, sowie einen damit verbundenen stärkeren Anstieg des Serum-Creatininwertes, der signifikant höher war als der Wert der Vergleichsgruppe.

Da Silva et al (38), die die Ratten, ohne ein akutes Nierenversagen herbeigeführt zu haben, mit SnMP, NaCl und einem HO-Aktivator SnCl₂ behandelt und die Wirkung

nach 24 Stunden gemessen haben, kamen ebenfalls zu dem Ergebnis, dass die Behandlung mit SnMP zu einer deutlichen Verminderung der Hämoxxygenaseaktivität führt.

Die am dritten postoperativen Tag in allen Ergebnissen der Nierenfunktions-Diagnostik (Inulin/PAH-Clearance) auffällige Tendenz der verbesserten Erholung der Clamping+SnMP-Gruppe im Vergleich zu den mit NaCl behandelten Tiere könnte durch eine reaktive Aktivierung der Hämoxxygenaseexpression erklärt werden. Diese Theorie wird durch die Ergebnisse von da Silva et al (38) gestützt, die herausfanden, dass SnMP, obwohl es ein unselektiver Inhibitor der Hämoxxygenase ist, zu einer Aktivierung der Genexpression der Hämoxxygenase-1 mit steigenden HO-1 Proteinwerten führt. Die Hämoxxygenase-2 ist interessanterweise nicht von diesem Phänomen der aktivierten Genexpression betroffen, sondern bleibt durch SnMP gehemmt.

Zu ähnlichen Ergebnissen kamen auch Kaizu et al (87), die diese Beobachtungen auch bei dem SnMP chemisch verwandten SnPP nachweisen konnten. Hier zeigte sich nach bereits 30 min unter SnPP-Exposition der Beginn der HO-1 mRNA Bildung, die nach 3 Stunden ihren Höhepunkt erreicht hatte und für 24 Stunden ein Plateau bildet. Nach bereits 6 Stunden konnte eine beginnende HO-1 Expression in der Niere nachgewiesen werden, die sich innerhalb von 24 Stunden signifikant zur Vergleichsgruppe erhöhte. Die Expression der HO-2 hingegen war nicht betroffen.

Eine vorübergehende starke Zunahme der HO-1 mRNA konnten auch Akagi et al (65) nach einem akuten ischämischen Nierenversagen in den Nieren von Ratten beobachten.

Differenzen zu anderen Arbeitsgruppen in den Ergebnissen gab es bei den Serum-Creatininwerten. In der hier vorliegenden Arbeit sind die Serum-Creatininwerte beider Vergleichsgruppen nach dem signifikanten Anstieg am ersten Tag bereits am dritten postoperativen Tag wieder auf Normwerte von 0-0,88 mg/dl gefallen.

Bei Kaizu et al (87) hingegen waren die Serum-Creatininwerte der Vergleichsgruppen zwar von ihrem Maximum am Tag eins an fallend, lagen aber trotzdem bis zum 7. postoperativen Tag über den Normwerten. Dieser Unterschied in der Beobachtung lässt sich durch das unterschiedlich gewählte Operationsverfahren erklären.

Kaizu et al führten eine Nephrektomie links aus und klemmten die rechte Nierenarterie für 60min ab, während in dieser Arbeit ein bilaterales Clampingverfahren und eine Ischämiezeit von 45 min gewählt wurde. Welcher Unterschied im Operationsverfahren wie viel Einfluß hat ist für uns nicht feststellbar.

Ab dem 7. und 14. postoperativen Tag war es anhand der Nierenfunktion nicht mehr nachweisbar, ob die Hämoxigenase vorher gehemmt wurde. Ursächlich hierfür könnte die Normalisierung der HO-1-Expression oder die bereits abgeschlossene HO-1 abhängige Rekompensation der renalen Funktion sein.

Leider fehlen für diesen Beobachtungszeitraum vergleichende Daten in der Literatur.

Die Funktion der Hämoxigenase-3 wurde in dieser Arbeit nicht speziell untersucht, da sie ähnlich wie die HO-2 nur konstitutiv vorhanden ist.

4.2.2 Die PAH-Nettosekretion

Da für den ersten und dritten Tag die größten Veränderungen in der PAH- und Inulin-Clearance beobachtet wurden, wurde für diese Zeitpunkte auch die PAH-Nettosekretion als Marker für die Sekretionsleistung des proximalen Tubulus berechnet.

Dabei zeigte sich, dass es wie bei der PAH- und Inulin-Clearance zu einer deutlichen Abnahme der PAH-Nettosekretion der Clamping+NaCl-Gruppe kam. Die Clamping+SnMP-Gruppe fiel noch deutlich unter die Werte der Vergleichsgruppe, so dass davon ausgegangen werden muß, dass es durch die Hemmung der Hämoxigenase zu einer deutlicheren Schädigungen im Bereich des Tubulus als bei der Clamping+NaCl-Gruppe gekommen ist.

Die Sham-Gruppen zeigten nur eine sehr geringe nicht signifikante Einschränkung der PAH-Nettosekretion im Vergleich zu den Nativ-Tieren (Tag 0) auf.

Am dritten postoperativen Tag kam es analog zu den Clearance-Werten zu einem Anstieg der tubulären PAH-Sekretionsleistung der Clamping+NaCl-Gruppe und der Clamping+SnMP-Gruppe auf nahezu identische Werte, die weiterhin signifikant unter den Werten der Nativ-Tiere (Tag 0) lagen .

Ähnliche Beobachtungen machten auch Schneider et al (108), die herausfanden, dass es nach der Ischämie zu einer Expressions-Abnahme der organischen Anionentransporter OAT1 und OAT3 kam, der mit dem tubulären Sekretionsverlust von PAH korrelierte. Auch zeigte sich, dass mit der Erholung von OAT1 und OAT3 im postoperativen Verlauf es auch wieder zu einer Steigerung der PAH-Nettosekretion und Clearance kam (108).

Obwohl die Erholung von OAT1 und OAT3 wahrscheinlich nur ein Teil ist der zur wiedererlangten Funktion beiträgt, scheint er doch von großer Bedeutung, da über diesen Stoffwechselweg neben Urämie-Toxine eine Vielzahl von Medikamenten renal eliminiert werden.

Die Abnahme der tubulären Sekretionsleistung, wie sie die Ergebnisse der PAH-Nettosekretion deutlich machen, scheint im Umkehrschluß ein wesentlicher Grund für die Abnahme der PAH-Clearance zu sein. Dies ist eine Übereinstimmung mit den Beobachtungen von Schneider et al (108) und Corrigan et al (109), die die reduzierte PAH-Sekretion als wichtigsten Mechanismus der reduzierten PAH-Clearance sehen.

4.2.3 Die PAH-Clearance

Die in der Arbeit von Rodriguez et al (88) gemachten Beobachtungen, dass die Behandlung mit SnMP von Nativ-Tieren zu einer Abnahme des renalen Blutflusses und einem Anstieg des vaskulären Widerstandes führt, konnte diese Arbeit nicht bestätigen. Falls es durch SnMP tatsächlich zu einer Abnahme des renalen Blutflusses und zu einer Vasokonstriktion gekommen wäre, hätte dies Auswirkungen auf die Inulin- und PAH-Clearanceleistung der Sham+SnMP-Tiere in unserem Modell haben müssen.

Die Sham+SnMP-Tiere zeigten wie auch die Sham+NaCl-Tiere nur einen sehr geringen Abfall der PAH- und Inulin-Clearanceleistung, der durch den Operationsstress zu erklären ist. Ein signifikanter Unterschied zwischen der Sham+NaCl-Gruppe und der Sham+SnMP-Gruppe ließ sich nicht feststellen.

4.2.4 Bilirubinwerte

Da die Hämoxygenase das geschwindigkeitslimitierende Enzym im Hämabbau ist, wäre zu vermuten, dass ihre Hemmung durch SnMP einen Effekt auf das Serum-Bilirubin der Versuchstiere hätte. Drummond et al (17) konnten eine Senkung der Bilirubinwerte durch SnMP bei Ratten mit delta-aminolevulin-Säure induzierten Hyperbilirubinämie nachweisen. Zur gleichen Ergebnissen kam auch die Studie über Hyperbilirubinämie beim Dubin-Johnson-Syndrom (14) bei Ratten. Sie zeigte, dass es zu einer signifikanten Abnahme der Bilirubinwerte über 48 Stunden nach SnMP-Gabe kam.

In dieser Arbeit konnten keine signifikanten Ergebnisse in der Veränderung der Bilirubinwerte gemessen werden. Trotzdem bestätigt die Tendenz der Werte die Annahme, dass SnMP Einfluss auf die Bilirubinwerte hat. Die Bilirubinkonzentration der Clamping+SnMP-Gruppe waren am ersten Tag niedriger als die Werte der Clamping+NaCl-Gruppe, am dritten Tag kam es durch die vermutete vermehrte Expression der Hämoxygenase-1 aber wieder zu höheren Bilirubinkonzentrationen bei den mit SnMP behandelten Tieren.

Interessant ist, dass die Sham+SnMP-Gruppe mit höheren Bilirubinkonzentrationen, als bei den Clamping+SnMP-Tieren, die gleichen Konzentrationsschwankungen wie die Clamping+SnMP-Gruppe während der ersten drei Tage aufweist. Dies lässt die Vermutung zu, dass SnMP zwar, wie durch die Serum-Creatininwerte und auch die Inulin/PAH-Clearance dargestellt, keinen Effekt auf die Funktion der gesunde Niere zu haben scheint, wohl aber auf den Bilirubinstoffwechsel.

4.2.5 Entzündungsparameter (CRP)

Von vielen Arbeitsgruppen wird der Entzündungsreaktion eine große Bedeutung am akuten Nierenversagen und seinen Folgen beigemessen (5, 16,18,67). Dies konnte zumindest anhand des klinisch etablierten Markers für eine systemische Entzündungsreaktion, dem CRP, nicht bestätigt werden, der während der gesamten Beobachtungsphase bei allen Gruppen im unteren Normbereich lag (siehe Abb.16). Dies belegt ein steriles Operationsverfahren.

Dies bedeutet allerdings nicht, dass keine Aktivierung auf der Ebene der Leukozyten stattfindet wie sie einige Autoren beschreiben. Dabei kommt es durch Vermehrung von Adhäsionsmolekülen und Verlust der endothelialen Barriere durch Interaktion mit Leukozyten und Thrombozyten zur Obstruktion von Arteriolen, was zu einer Verstärkung eines ischämischen akuten Nierenversagens führen kann. Die Leukozyten werden durch zahlreiche lokale Faktoren wie Cytokine, Chemokine und Sauerstoffradikale aktiviert (5,18).

4.2.6 Stickstoffmonoxyd / Kohlenmonoxyd

Wie einleitend bereits erwähnt hat NO die Aufgabe, die Natriurese und Diurese in der Niere zu fördern (94). Das über die HO-1 gebildete Kohlenmonoxid könnte, unter pathologischen Bedingungen, durch seine vasodilatierende Wirkung wichtig für die Durchblutung der Niere, was vor allem beim funktionellen NO-Defizit von Bedeutung ist (93). Der gemeinsame „Angriffspunkt“ von NO und CO ist die lösliche Guanylat-Cyclase, die über die Synthese von cGMP in den glatten Muskeln der Gefäße zu einer Vasodilatation führt.

Es bleibt die Frage, ob und wie weit NO bei Hemmung der Hämoxxygenasen durch SnMP, ähnlich wie CO bei „Ausfall“ des NO-Systems, über eine vermehrte NO-Generation zum Schutz der Niere beim akuten ischämischen Nierenversagen beiträgt. Diese Frage war, obwohl für das akute Nierenversagen von Bedeutung, nicht Gegenstand der Untersuchung dieser Arbeit.

4.3 Zusammenfassung und klinische Relevanz

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Effekte auf die Hemmung der Hämoxxygenasen durch SnMP besonders in den ersten drei Tagen nach dem akuten ischämischen Nierenversagen auf die Nierenfunktion besonders deutlich sind.

Am ersten postoperativen Tag nach Induktion des akuten ischämischen Nierenversagens reagierte die Nierenfunktion durch die Hemmung der Hämoxxygenase mit einer

deutlichen Verschlechterung der Inulin-, PAH-Clearance bis auf 1/5 des Ausgangswertes sowie mit einem damit korrelierendem Anstieg der Retentionswerte Creatinin und Harnstoff. Bereits am dritten Tag nach dem akuten ischämischen Nierenversagen kam es durch eine vermutliche Stimulation der Expression der Hämoxxygenase-1 zu einer raschen Erholung und Verbesserung der Nierenfunktion, was sich vor allem im Abfall der Retentionswerte bis knapp über den Ausgangswert und eine zwar nicht signifikante, aber in den Ergebnissen doch ablesbare bessere Inulin- und PAH-Clearance der mit SnMP behandelten Tier-Gruppen ausdrückt. Bei den Auswertungspunkten am siebten und vierzehnten postoperativen Tag zeigten sich nur noch sehr geringe Schwankungen in den einzelnen Untersuchungsgruppen, ohne signifikante Unterschiede zu zeigen.

Ein Ansatzpunkt für zukünftige Therapien wäre, unter der Voraussetzung dass sich die im Tierexperiment gewonnen Daten auf den Menschen übertragen lassen, Patienten mit akutem ischämischen oder durch andere Genese erworbenem Nierenversagen durch eine gezielte Stimulation der induzierbaren HO-1 zu behandeln. Dies könnte die Krankenhausverweildauer, die von vielen Patienten benötigte Hämodialyse oder Hämofiltration, die vor allem in der ersten Zeit nach einem akuten Nierenversagen benötigt wird, sowie die Mortalität und Morbidität je nach Schwere der Erkrankung verkürzen. Dies wäre nicht nur in einer Zeit, in der das Gesundheitssystem kaum noch zu bezahlen ist und Krankenhäuser immer mehr wie wirtschaftliche Unternehmen geführt werden müssen, eine große Kostenersparnis. Dies gilt gerade bei immer noch steigender Zahl dialysepflichtiger Patienten (ca. 80.000 im Jahr 2004) und Ausgaben, die bei ca. 50.000 €/Jahr und Patient liegen. Würde es gelingen, die Dialysebehandlung bei den Patienten für nur ein Jahr hinauszuzögern, könnte man bis zu 400 Millionen Euro pro Jahr einsparen. Aber auch für den Patienten würden sich viele Vorteile ergeben. Zum einen wäre die Behandlung wesentlich weniger invasiv und auch die bei der Hämodialyse immer noch bestehende Gefahr der Ansteckung mit Hepatitis-Viren (v.a. B und C) würde gesenkt.

5. Zusammenfassung

Bei der tierexperimentellen Untersuchung der Nierenfunktion nach akutem ischämischen Nierenversagen über einen Zeitraum von vierzehn Tagen konnte gezeigt werden, dass die Behandlung der Tiere mit dem Hemmstoff der Hämoxigenase SnMP im Vergleich zu den mit NaCl behandelten Tieren zu einer deutlichen Verschlechterung der Nierenleistung am ersten postoperativen Tag führt.

Die Hämoxigenasen, die einerseits als konstitutiver Regulator (HO-2) für den Häm-Abbau und damit im Rahmen des Stoffwechsels für die Freisetzung von CO verantwortlich sind, andererseits unter pathologischen Bedingungen erst expremiert werden (HO-1), spielen unter anderem über CO als Vasodilatator eine wichtige Rolle bei der Durchblutung der Niere.

Die Nierenfunktion wurde durch die Retentionswerte Serum-Creatinin und Serum-Harnstoff, die Inulin/PAH-Clearance und die PAH-Nettosekretion quantifiziert. Zusätzlich wurden Bilirubin wegen des großen Einflusses der Hämoxigenase als geschwindigkeitslimitierendes Enzym des Hämabbaus und CRP als Entzündungsmarker bestimmt.

SnMP hatte keine Wirkung auf die Funktion der gesunden Niere, was im Sham-Eingriff dokumentiert wurde.

Der negative Effekt des SnMP auf die Nierenfunktion zeigt sich besonders in der frühen Phase (erster postoperativer Tag) der Blockade der Hämoxigenasen, an dem es zu einer signifikanten Verschlechterung der Nierenfunktion (Clearance-Messung, Retentionswerte und PAH-Nettosekretion) der Clamping+SnMP-Gruppe im Vergleich zur Clamping+NaCl-Gruppe kam. Am dritten postoperativen Tag gab es bereits keine signifikanten Unterschiede mehr in der Nierenfunktion der Vergleichsgruppen. Eine tendenziell stärkere Erholung der Nierenfunktion bei der Clamping+SnMP-Gruppe lässt vermuten, dass es nach der Hemmung mit SnMP zu einer vermehrten Stimulation der Genexpression der Hämoxigenase kam. Am siebten und vierzehnten postoperativen Tag gab es keine Unterschiede zwischen den Vergleichsgruppen.

Der Bilirubinkonzentration zeigte in unserem Modell nur im Trend die beschriebenen Konzentrationsabnahme im Serum der mit SnMP behandelten Versuchsgruppen bei

insgesamt nur sehr geringen Konzentrationsschwankungen. Der Entzündungsparameter CRP blieb über den gesamten Zeitraum bei allen Versuchsgruppen im unteren Normbereich, was eine systemische Entzündung ausschließt und damit ein steriles Operationsverfahren und Wundversorgung bestätigt. Lokale Inflammationsprozesse der Niere aufgrund des akuten ischämischen Nierenversagens waren nicht durch signifikante Veränderungen des Akutephase-Proteins CRP detektierbar.

Klinisch relevant könnten diese Daten in Zukunft sein, da sie zeigen, dass die Hemmung eines Schlüsselenzyms der Nephroprotektion, der HO-1 mit der dabei zu vermutenden Minderung der CO-Freisetzung zur signifikanten Verschlechterung der Nierenfunktion in den ersten drei postischämischen Tagen führen. Daraus ließen sich für die Behandlung des akuten ischämischen Nierenversagens durch gezielte Stimulation der induzierbaren HO-1 vielleicht protektive Medikamente entwickeln.

6. Literaturverzeichnis

1. Robert W. Schrier, Wie Wang, Brian Poole, Amit Mitra: Acute renal failure: definitions, diagnosis, pathogenesis and therapy. *J Clinical Invest.* 114: 5-14, 2004
2. Robert A. Star: Perspectives in Renal Medicine. Treatment of acute renal failure. *Kidney Int.* 54: 1817-1831, 1998
3. Joseph V. Bonventre and Joel M. Weinberg: recent Advances in the Pathophysiology of Ischemic Acute Renal Failure. *J Am Soc Nephrol* 14: 2199-2210, 2003
4. Teschan P.E., et al : Post-traumatic renal insufficiency in military casualties.
I. Management, use of artificial kidney, prognosis. *Am J Med* 18: 172-186, 1955
5. Thadhani R, Pascual M, Bonventre JV: Medical progress- Acute renal failure. *N Engl J Med* 334: 1448-1460, 1996
6. Chertow GM, Levy EM, Hammermeister KE, Grover F, Daley J: Independent association between acute renal failure and mortality following cardiac surgery. *Amer J Med* 104: 343-348, 1998
7. Herold G: *Innere Medizin*: 531-534, 2004
8. Carvounis CP, Nisar S, Guro-Razuman S: Significance of the fractional excretion of urea in the differential diagnosis of acute renal failure. *Kidney Int* 62: 2223-2229, 2002
9. Miller TR, et al.: Urinary diagnostic indices in acute renal failure: a prospective study *Ann Intern Med* 89: 47-50, 1978
10. Hou SH, Buschinsky DA, Wish JB, Cohen JJ, Harrington JT: Hospital-acquired renal insufficiency: A prospective study. *Am J Med* 74: 243-248, 1983
11. Shusterman N, Strom BL, Murray TG, Morrison G, West SL, Maislin G: Risk factors and outcome of hospital acquired acute renal failure: Clinical epidemiologic study. *Am J Med* 83: 65-71, 1987
12. Ichimura T, Bonventre JV, Bailly V, Wie H, Hession CA, Cate RL, Sanicola M: Kidney injury molecule-1 (KIM-1), a putative epithelial cell adhesion molecule containing a novel immunoglobulin domain, is up-regulated in renal cells after injury. *J Biol Chem* 273:4135-4142, 1998

13. Han WK, Bailly V, Abichandani R, Thadhani R, Bonventre JV: Kidney injury molecule-1 (KIM-1): A novel biomarker for human renal proximal tubule injury. *Kidney Int* 62: 237-244, 2002
14. Drummond GS, Kappas A: Sn-mesoporphyrin suppression of hyperbilirubinemia in EHBR/Eis rats, an animal model of dubin-johnson syndrome. *Pharmacol* 56: 158-164, 1998
15. Parikh CR, Jani A, Melnikov VY, Faubel S, Edelstein CL: Urinary interleukin-18 is a marker of human acute tubular necrosis. *Am J Kidney Dis* 43: 405-414; 2004
16. Kribben A, Edelstein CL, Schrier RW: Pathophysiology of acute renal failure. *J Nephrol* 12(Suppl. 2): 142-151, 1999
17. Drummond GS, Galbraith RA, Sardana MK, Kappas A: Reduction of the C2 and C4 vinyl groups of Sn-protoporphyrin to form Sn-mesoporphyrin markedly enhances the ability of the metalloporphyrin to inhibit in vivo heme catabolism. *Arch Biochem Biophys* 15: 64-74, 1987
18. Solez K, Kramer EC, Fox JA, Heptinstall RH: Medullary plasma flow and intravascular leukocyte accumulation in acute renal failure. *Kidney Int* 6: 24-37, 1972
19. Conger JD, Robinette JB, Schrier RW: Smooth muscle calcium and endothelium-derived relaxing factor in the abnormal vascular responses of acute renal failure. *J Clin Invest* 82: 532-537, 1988
20. Molitoris BA, Sandoval R, Sutton TA: Endothelial injury and dysfunction in ischemic acute renal failure. *Crit Care Med* 30 (Suppl. 5): 235-240, 2002
21. Sutton TA, Fisher CJ, Molitoris BA: Microvascular endothelial injury and dysfunction during ischemic acute renal failure. *Kidney Int* 62: 1539-1549, 2002
22. Badr KF, et al.: Mesangial cell, glomerular and renal vascular response to endothelin in the rat kidney. Elucidation of signal transduction pathways. *J Clin Invest* 83: 336-342, 1989
23. Conger JD, Weil JV: Abnormal vascular function following ischemia-reperfusion injury. *J Investig Med* 43: 431-442, 1995
24. Oken DE: Hemodynamic basis for human acute renal failure (vasomotor nephropathy). *Am J Med* 76: 702-710, 1984

25. Molitoris BA, Chan LK, Shapiro JI, Conger JD, Falk SA: Loss of epithelial polarity: a novel hypothesis for reduced proximal tubule Na⁺ transport following ischemic injury. *J Membr Biol* 107: 119-127, 1989
26. Schnermann J; Homer W Smith Award lecture. The juxtaglomerular apparatus: from anatomical peculiarity to physiological relevance. *J Am Soc Nephrol* 14: 1681-1694, 2003
27. Molitoris BA, Falk SA, Dahl RH: Ischemia- induced loss of epithelial polarity. Role of the tight junction. *J Clin Invest* 84: 1334-1339, 1989
28. Sutton TA; Molitoris BA: Mechanisms of cellular injury in ischemic acute renal failure. *Semin Nephrol* 18: 490-497, 1998
29. Kwon O, Nelson WJ, Sibley R, Huie P, Scandling JD, Dafoe D, Alfrey E, Myers BD: Backleak, light junctions, and cell-cell adhesion in postischemic injury to the renal allograft. *J Clin Invest* 101: 2054-2064, 1998
30. Moran SM, Meyers BD: Course of acute renal failure studied by a model of creatinine kinetics. *Kidney Int* 27: 928-937, 1985
31. Wangsiripaisan A, Gangaro PE, Edelstein CL, Schrier RW: Role of polymeric Tamm-Horsfall protein in cast formation: oligosaccharide and tubular fluid ions. *Kidney Int* 59: 932-940, 2001
32. Mason J, Torhorst J, Welsch J: Role of the medullary perfusion defect in the pathogenesis of ischemic renal failure. *Kidney Int* 26: 283-293, 1984
33. De Greef KE, Ysbaert DK, Dauwe S, Persy V, Vercauteren SR, Mey D, De Broe ME: Anti-B7-1 blocks mononuclear cell adherence in vasa recta after ischemia. *Kidney Int* 60:1415-1427, 2001
- 34 Takada M, Chandraker A, Nadeau KC, Sayegh MH, Tilney NL: The role of the B7 costimulatory pathway in experimental cold ischemia/reperfusion injury. *J Clin Invest* 100:1199-11203, 1997
35. Bonventre JV: Mechanisms of ischemic acute renal failure. *Kidney Int* 43:1160-1178, 1993
36. Marrs JA, Gopalakrishnan S, Bacallao RL: Tight junction and adherens junction dysfunction during ischemic injury. In: *Acute Renal Failure: A Companion to Brenner and Rector's The Kidney*, edited by Molitoris BA, Finn WF, Philadelphia, W.B.Saunders, 2001, p. 132-142

37. Lieberthal W, Nigam SK: Acute renal failure. II. Experimental models of acute renal failure: imperfect but indispensable. *Am J Physiol Renal Physiol* 278 F1-F12, 2000
38. Da Silva JL, Zand BA, Yang LM, Sabaawy HE, Lianos E, Abraham NG: Heme oxygenase isoform-specific expression and distribution in the rat kidney. *Kidney Int* 59: 1448-1457, 2001
39. Zager RA, Schimpf BA, Gmur DJ: Physiological pH: Effects on posthypoxic proximal tubular injury. *Circ Res* 72:837-846, 1993
40. Weinberg JM, Venkatachalam MA, Roeser NF, Saikumar P, Dong Z, Senter RA, Nissim I: Anaerobic and aerobic pathways for salvage of proximal tubules from hypoxia-induced mitochondrial injury
41. Denton MD, Chertow GM, Brady HR: "Renal-dose" dopamine for the treatment of acute renal failure: Scientific rationale, experimental studies and clinical trials. *Kidney Int* 50: 4-14, 1996
42. Chertow GM, Sayegh MH, Allgren RL, Lazarus JM: Is the administration of dopamine associated with adverse or favourable outcomes in acute renal failure? *Am J Med* 101: 49-53, 1996
43. Conger JD: Interventions in clinical acute renal failure: What are the data? *Am J Kidney Dis* 26: 565-576, 1995
44. Kellum JA: Use of diuretics in the acute care setting. *Kidney Int* 53 (Suppl. 66): 67-70, 1998
45. Fink M: Are diuretics useful in the treatment or prevention of acute renal failure? *South Med J* 75: 329-334, 1982
46. Lieberthal W, Levinsky NG: Treatment of acute tubular necrosis. *Semin Nephrol* 10: 571-583, 1990
47. Better OS, Rubinstein I, Winaver JM, Knochel JP: Mannitol therapy revisited (1940-1997). *Kidney Int* 52: 886-894, 1997
48. Lieberthal W, Sheridan AM, Valeri CR: Protective effect of atrial natriuretic factor and mannitol following renal ischemia. *Am J Physiol* 258: 1266-1272, 1990
49. Conger JD, Falk SA, Hammonds WS: Atrial natriuretic peptide and dopamine in established acute renal failure in the rat. *Kidney Int* 40: 21-28, 1991

50. Rahman SN, Kim GE, Mathew AS, Goldberg CA, Allgren R, Schrier RW, Conger JD: Effects of atrial natriuretic peptide in clinical acute renal failure. *Kidney Int* 45: 1731-1738, 1994
51. Chertow GM, Christiansen CL, Cleary PD, Munro C, Lazarus JM: Prognostic stratification in critically ill patients with acute renal failure requiring dialysis. *Arch Intern Med* 155: 1505-1511, 1995
52. Nath KA, Haggard JJ, Croatt AJ, Grande JP, Poss KD, Alam J: The indispensability of heme oxygenase-1 in protecting against acute heme protein-induced toxicity in vivo. *Am J Pathol* 156: 1527-1535, 2000
53. Toda N, Takahashi T, Mizobuchi S, Fujii H, Nakahira K, Takahashi S, Yamashita M, Morita K, Hirakawa M, Akagi R: Tin chloride pretreatment prevents renal injury in rats with ischemic acute renal failure. *Crit Care Med* 30: 1512-1522, 2002
54. Maines MD: The heme oxygenase system: a regulator of second messenger gases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 37: 517-554, 1997
55. McCoubrey WK Jr, Huang TJ, Maines MD: Isolation and characterization of a cDNA from the rat brain that encodes hemoprotein heme oxygenase-3. *Eur J Biochem* 247: 725-732, 1997
56. McCoubrey WK Jr, Ewing JF, Maines MD: Human heme oxygenase-2: Characterization and expression of a full-length cDNA and evidence suggesting that the two HO-2 transcripts may differ by choice of polyadenylation signal. *Arch Biochem Biophys* 295: 13-20, 1992
57. Shibahara S, Yoshizawa M, Suzuki H, et al.: Functional analysis of cDNAs for two types of human heme oxygenase and evidence for their separate regulation. *J Biochem* 113: 214-218, 1997
58. Agarwal A, Nick HS: Renal response to tissue injury: lessons from heme oxygenase-1 gene ablation and expression. *J Am Soc Nephrol* 11: 965-973, 1998
59. Choi AM, Alam J: Heme oxygenase-1: function, regulation, and implication of a novel stress-inducible protein in oxidant-induced lung injury. *Am J Respir Cell Mol Biol* 15: 9-19, 1996
60. Dennery PA: Regulation and role of heme oxygenase in oxidative injury. *Curr Top Cell Regul* 36: 181-199, 2000

61. Dong Z, Lavrovsky Y, Venkatachalam MA, Roy AK: Heme oxygenase-1 in tissue pathology: the Ying and Yang. *Am J Pathol* 156: 1485-1488, 2000
62. Durante W. Heme oxygenase-1 in growth control and its clinical application to vascular disease. *J Cell Physiol* 195: 373-382, 2003
63. Galbraith R: Heme oxygenase: who needs it? *Proc Soc Exp Biol Med* 222: 299-305, 1999
64. Maines MD, Mayer RD, Ewing JF, McCoubrey WK jr: Induction of kidney heme oxygenase-1 (HSP32) mRNA and protein by ischemia/reperfusion: possible role of heme as both promotor of tissue damage and regulator of HSP32. *J Pharmacol Exp Ther* 264: 457-462, 1993
65. Shimizu H, Takahashi T, Suzuki T, Yamasaki A, Fujiwara T, Odaka Y, Hirakawa M, Fujita H, Akagi R: Protective effect of heme oxygenase induction in ischemic acute renal failure. *Crit Care Med* 28: 809-817, 2000
66. Shiraishi F, Curtis LM, Truong L, Poss K, Visner GA, Madsen K, Nick HS, Agarwal A: Heme oxygenase-1 gene ablation or expression modulates cisplatin-induced renal tubular apoptosis. *Am J Physiol Renal Physiol* 278:726-736, 2000
67. Vogt BA, Shanley TP, Croatt A, Alam J, Johnson KJ, Nath KA: Glomerular inflammation induces resistance to tubular injury in the rat. A novel form of acquired, heme oxygenase-dependent resistance to renal injury. *J Clin Invest* 98: 2139-2145, 1996
68. Nath KA, Balla G, Vercellotti GM, Balla J, Jacob HS, Levitt MD, Rosenberg ME: Induction of heme oxygenase is a rapid, protective response in rhabdomyolysis in the rat. *J Clin Invest* 90: 267-270, 1992
69. Shibahara S: Regulation of heme oxygenase gene expression. *Semin Hematol* 25: 370-376, 1988
70. Juckett MB, Balla J, Jessurun J et al.: Ferritin protects endothelial cells from oxidized low density lipoprotein in vivo. *Am J Pathol* 147: 782-789, 1995
71. Abraham NG, Lin JH, Schwartzman ML et al.: The physiological significance of heme oxygenase. *Int J Biochem* 20: 543-558, 1988
72. Abraham NG, Drummond GS, Lutton JD, Kappas A: Biological significance physiological role of heme oxygenase. *Cell Physiol Biochem* 61: 129-168, 1996

73. Zhang J, Piantadosi CA: Mitochondrial oxidative stress after carbon monoxide hypoxia in the rat brain. *J Clin Invest* 90: 1193-1199, 1992
74. Dennery PA, Seidman DS, Stevenson DK: Neonatal hyperbilirubinemia. *N Engl J Med* 344: 581-590, 2001
75. Pimstone NR, Engel P, Tenhunen R, Seitz PT, Marver HS, Schmid R: Inducible heme oxygenase in the kidney: a model for the homeostatic control of haemoglobin catabolism. *J Clin Invest* 50: 2042-2050, 1971
76. Alam J, Shibahara S, Smith A: Transcriptional activation of the heme oxygenase gene by heme and cadmium in mouse hepatoma cells. *J Biol Chem* 264: 6371-6375, 1989
77. Hill-Kapturczak N, Chang SH, Agarwal A: Heme oxygenase and the kidney. *DNA Cell Biol* 21: 307-321, 2002
78. Nath KA, Grande JP, Croatt AJ, Likely S, Hebbel RP, Enright H: Intracellular targets in heme protein-induced renal injury. *Kidney Int* 53: 100-111, 1998
79. Platt JL, Nath KA: Heme oxygenase: protective gene or Trojan horse. *Nat Med* 4: 1364-1365, 1998
80. Kutty RK, Kutty G, Rodriguez IR, Chader GJ, Wiggert B: Chromosomal localization of the human heme oxygenase genes: heme oxygenase-1 (HMOX1) maps to chromosome 22q12 and heme oxygenase-2 (HMOX2) maps to chromosome 16p13.3. *Genomics* 20: 513-516, 1994
81. Sun J, Hoshino H, Takaku K, Nakajima O, Muto A, Suzuki H, Tashiro S, Takahashi S, Shibahara S, Alam J, Taketo MM, Yamamoto M, Igarashi K: Hemoprotein Bach1 regulates enhancer availability of heme oxygenase-1 gene. *EMBO J* 21: 5216-5224, 2002
82. Kitamuro T, Takahashi K, Ogawa K, Udono-Fujimori R, Takeda K, Furuyama K, Nakayama M, Sun J, Fujita H, Hida W, Hattori T, Shirato K, Igarashi K, Shibahara S: Bach1 functions as a hypoxia-inducible repressor for the heme oxygenase-1 gene in human cells. *J Biol Chem* 278: 9125-9133, 2003
83. Itoh K, Wakabayashi N, Katoh Y, Ishii T, Igarashi K, Engel JD, Yamamoto M: Keap1 represses nuclear activation of antioxidant responsive elements by Nrf2 through binding to the amino-terminal Neh2 domain. *Genes Dev* 13, 76-86, 1999

84. Ishii T, Itoh K, Takahashi S, Sato H, Yanagawa T, Katoh Y, Bannai S, Yamamoto M: Transcription factor Nrf2 coordinately regulates a group of oxidative stress-inducible genes in macrophages. *J Biol Chem* 275, 16023-16029, 2000
85. Nath KA, Haggard JJ, Croatt AJ, Grande JP, Poss KD, Alam J: The indispensability of heme oxygenase-1 in protecting against acute heme protein-induced toxicity in vivo. *Am J Pathol* 156: 1527-1535, 2000
86. Bundock EA, Drummond GS, Kappas A. The Rockefeller University: New Release. Tissue distribution of synthetic heme analogues: studies with chromium and zinc mesoporphyrins. *Pharmacol* 52: 187-198, 1996
87. Kaizu T, Tamaki T, Tanaka M, Uchida Y, Tsuchihashi SI, Kawamura A, Kakita A: Preconditioning with tin-protoporphyrin IX attenuates ischemia/reperfusion injury in the rat kidney. *Kidney Int* 63: 1393-1403, 2003
88. Rodriguez F, Zhang F, Dinocca S, Nasjletti A: Nitric oxide synthesis influences the renal vascular response to heme oxygenase inhibition. *Am J Physiol Renal Physiol* 284: 1255-1262, 2003
89. Schneider R, Raff U, Vornberger N, Schmidt M, Freund R, Reber M, Schramm L, Gambaryan S, Wanner C, Schmidt HHHW, Galle J: L-arginin counteracts nitric oxide deficiency and improves the recovery phase of ischemic acute renal failure in rats. *Kidney Int* 64: 216-225, 2003
90. Akagi R, Takahashi T, Sassa S: Fundamental role of heme oxygenase in the protection against ischemic acute renal failure. *Jpn J Pharmacol* 88: 127-132, 2002
91. Sikorski EM, Hock T, Hill-Kapturczak N, Agarwal A: The story so far: molecular regulation of the heme oxygenase-1 gene in renal injury. *Am J Physiol Renal Physiol* 286: 425-441, 2004
92. Drummond GS: Control of heme metabolism by synthetic metalloporphyrins. *Am NY Acad Sci* , 1987
93. Botros FT, Navar LG: Interaction between endogenously-produced carbon monoxide and nitric oxide in regulation of renal afferent arterioles. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* (July 14,2006)
94. Mount PF, Power DA: Nitric oxide in the kidney: functions and regulation of synthesis. *Acta Physiol* 2006

95. Morita T, Perrella MA, Lee M, Kourembanas S. Smooth muscle cell-derived carbon monoxide is a regulator of vascular cGMP. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 1475-1479, 1995
96. Wang R, Wu L. The direct effect of carbon monoxide on KCa channels in vascular smooth muscle cells. *Pfluegers arch* 434: 285-291, 1997
97. Goodman AI, Chander PN, Rezzani R, Schwartzman ML, Regan RF, Rodella L, Turkseven S, Lianos EA, Dennery PA, Abraham NG. Heme oxygenase-2 deficiency contributes to diabetes-mediated increase in superoxide anion and renal dysfunction. *J Am Soc Nephrol* 17: 1073-1081, 2006
98. Feng MG, Li M, Navar LG. T-type calcium channels in the regulation of afferent and efferent arterioles in rats. *Am J Physiol Renal Physiol* 286: F331-F337, 2004
99. Rodriguez F, Lamon BD, Gong W, Kemp R, Nasjletti A. Nitric oxide synthesis inhibition promotes renal production of carbon monoxide. *Hypertension* 43: 347-351, 2004
100. Majid DSA, Navar LG. Nitric oxide in the control of renal hemodynamics and excretory function. *Am J Hypertens* 14, 74S-82S, 2001
101. Majid DSA, Williams A, Navar LG. Inhibition of nitric oxide synthesis attenuates pressure-induced natriuretic responses in anaesthetized dogs. *Am J Physiol Renal Physiol* 262, F718-722, 1993
102. Wilcox CS. Role of macula densa NOS in tubuloglomerular feedback. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 7, 443-449, 1998
103. Ortiz PA, Garvin JL. Role of nitric oxide in the regulation of nephron transport. *Am J Physiol Renal Physiol* 282, F777-F784, 2002
104. Stuehr DJ. Mammalian nitric oxide synthases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)- Bioenergetics* 1411, 217-230, 1999
105. Mount PF, Fraser SA, Watanabe Y, Lane N, Katsis F, Chen ZP, Kemp BE, Power DA. Phosphorylation of neuronal and endothelial nitric oxide synthase in the kidney with high and low salt diets. *Nephron Physiol* 102: 36-50, 2005
106. Stumm MM, D'Orazio D, Sumanovski LT, Martin PY, Reichen J, Sieber CC. Endothelial, but not the inducible nitric oxide synthase is detectable in normal and portal hypertensive rats. *Liver* 22, 441-450, 2002

107. Kosaka H, Yoneyama H, Zhang L, Fujii S, Yamamoto A, Igarashi J. Induction of LOX-1 and iNOS expressions by ischemia-reperfusion of rat kidney and the opposing effect of L-arginine. *FASEB J* 17, 636-643, 2003
108. Schneider R, Sauvant C, Betz B, Otremba M, Fischer D, Holzinger H, Wanner C, Galle J, Gekle M. Downregulation of organic anion transporters OAT1 and OAT3 correlates with impaired secretion of para-aminohippurate after ischemic acute renal failure in rats. *Am J Physiol Renal Physiol* 292: 1599-1605, 2007
109. Corrigan G, Ramaswamy D, Kwon O, Sommer FG, Alfrey EJ, Dafoe DC, Olshen RA, Scandling JD, Myers BD. PAH extraction and estimation of plasma flow in human postischemic acute renal failure. *Am J Physiol Renal Physiol* 277: F 312-F318. 1999

Abbildungsverzeichnis

Abb.1 In Anlehnung an Figure 1 aus Agarwal A, Nick HS. Renal response to tissue injury: lessons from heme oxygenase-1 gene ablation and expression. *J Am Soc Nephrol* 11: 965-973, 2000

Abb.2 In Anlehnung an Figure 2 aus Akagi R, Takahashi T, Sassa S. Fundamental role of heme oxygenase in the protection against ischemic acute renal failure. *Jpn J Pharmacol* 88, 127-132, 2002

Abb.3 Foto by Frieder Pullig

Abb.4 Foto by Frieder Pullig

Abb.5 Foto by Frieder Pullig

Abb.6 Foto by Frieder Pullig

Danksagung

Herrn Prof. Dr. med. J Galle danke ich herzlich für die Möglichkeit zur Bearbeitung des Themas und für die wissenschaftliche Unterstützung bei der Erstellung dieser Arbeit.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. med. Reinhard Schneider ohne dessen Anleitung, Hilfsbereitschaft und Unterstützung bei den Experimenten und statistischer Auswertung der Ergebnisse die Erstellung der Arbeit nicht möglich gewesen wäre. Ebenso Danke ich ihm für die Durchsicht meiner Arbeit.

Vielen Dank auch Herrn Prof. Dr. med. C. Wanner für die Beurteilung der Arbeit und Herrn C. Sauvant für Durchführung der mündliche Prüfung.

Nicht zuletzt danke ich meinen Eltern, die mir das Studium und damit die Anfertigung dieser Arbeit ermöglicht haben.

LEBENS LAUF VON FRIEDER PULLIG

PERSÖNLICHE ANGABEN:

Geburtsdatum	20.05.1979
Geburtsort	Paderborn
Staatsangehörigkeit	Deutsch
Familie	Eltern: Dr. Karl-Klaus Pullig, Universitätsprofessor, Sieglinde Pullig, Apothekerin; 2 ältere und 1 jüngere Schwester;
Familienstand	ledig

SCHULBILDUNG:

1985-1998	Waldorfschule Schloss-Hamborn bei Paderborn Abschluss: Abitur (allgemeine Hochschulreife)
-----------	--

ZIVILDIENTST:

1998-1999	Rettungsdienst (Malteser-Hilfsdienst Paderborn/Borchen/Hövelhof)
-----------	---

STUDIUM:

1999-2006	Julius-Maximilians Universität Würzburg
08/2001	Physikum (Note: 3,3)
08/2002	1. Staatsexamen (Note: 3,0)
04/2005	2. Staatsexamen (Note: 2,0)
06/2006	3. Staatsexamen (Note: 1,0)

BERUF:

09/2006	Allgemein-Chirurgische Klinik Städtisches Klinikum Karlsruhe Prof. Dr. M. Schön
---------	---

Frieder Pullig

