

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

**Wirkung von Rosiglitazon im Tiermodell
des ischämischen akuten Nierenversagens**

Inaugural - Dissertation

**zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der
Julius-Maximilians-Universität Würzburg**

vorgelegt von

Boris Betz

aus Würzburg

Würzburg, November 2009

Referent: Priv.-Doz. Dr. rer. nat. Christoph Sauvant

Koreferent: Prof. Dr. med. Christoph Wanner

Dekan: Prof. Dr. med. M. Frosch

Tag der mündlichen Prüfung : 23.03.2010

Der Promovend ist Arzt

Meinen Großeltern

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1. Das akute Nierenversagen.....	1
1.1.1. Terminologie.....	1
1.1.2. Einteilung.....	3
1.1.3. Epidemiologie.....	4
1.1.4. Klinischer Verlauf.....	5
1.1.5. Pathophysiologie des ischämischen Nierenversagens.....	5
1.1.6. Therapie.....	7
1.2. Der NO- Stoffwechsel.....	8
1.2.1. NO - Stickstoffmonoxid.....	8
1.2.2. Die NO-Synthase (NOS).....	10
1.2.3. Neuronale NO-Synthase (nNOS).....	12
1.2.4. Endotheliale NO-Synthase (eNOS).....	12
1.2.5. Induzierbare NO-Synthase (iNOS).....	13
1.2.6. Die Regulation der NO-Synthasen im akuten Nierenversagen.....	13
1.3. Methylarginine.....	14
1.3.1. Asymmetrisches Dimethylarginin (ADMA).....	14
1.3.2. Symmetrisches Dimethylarginin (SDMA).....	18
1.4. Das L-Arginin-Paradox.....	20
1.5. Rosiglitazon.....	23
1.6. Arbeitshypothese.....	26
2. Material und Methoden	29
2.1. Gewinnung der Proben.....	29
2.1.1. Versuchstiere.....	29
2.1.2. Versuchsgruppen.....	29
2.1.3. Operation zur Induktion des akuten Nierenversagens.....	30
2.1.4. Mess- / Entnahmeoperation.....	31

2.2.	Nierenfunktionsmessung.....	32
2.2.1.	Inulin-Clearance.....	32
2.2.2.	PAH-Clearance.....	33
2.3.	Weitere Messungen.....	34
2.3.1.	Aufarbeitung der Proben.....	34
2.3.2.	Western-Blot Analyse.....	34
2.3.3.	real-time PCR.....	37
2.3.4.	Serum-Messungen.....	38
2.4.	Auswertungsverfahren und Statistische Methoden.....	38
3.	Ergebnisse.....	39
3.1.	Gewichtsverteilung.....	39
3.2.	Postoperative Messung funktioneller Parameter.....	39
3.2.1.	Inulin – Clearance / PAH – Clearance.....	39
3.2.2.	PAH-Nettosekretion.....	41
3.3.	Beteiligung des eNOS-Signalweges.....	43
3.3.1	Phosphoryliertes eNOS Ser1177.....	43
3.3.2	Phosphoryliertes eNOS Ser633.....	45
3.3.3.	Akt-Phosphorylierung an Ser473.....	46
3.3.4	Expression der eNOS-mRNA.....	48
3.4.	Die Beteiligung des iNOS-Signalweges.....	51
3.4.1.	Expression der iNOS-mRNA.....	51
3.4.2.	Expression von ED-1.....	53
3.4.3.	Expression der Cleaved Caspase 3 (CC3).....	54
3.5.	ADMA / DDAH 1 + 2 / PRMT 1 – Metabolismus.....	57
3.5.1.	Der ADMA – Serumspiegel.....	57
3.5.2.	Expression von PRMT 1.....	59
3.5.3.	Expression von DDAH 2.....	60
3.5.4.	Expression von DDAH 1.....	61

3.6.	L-Arginin und der L-Arginin/ADMA-Quotient.....	62
3.6.1.	Der L-Arginin – Serumspiegel.....	62
3.6.2.	Der L-Arginin/ADMA-Quotient.....	64
3.7.	SDMA.....	66
3.8.	Zusammenfassung der Ergebnisse.....	68
4.	Diskussion.....	70
4.1.	Methodik.....	70
4.2.	Nierenfunktion.....	70
4.3.	Rosiglitazon und eNOS.....	74
4.4.	Rosiglitazon und iNOS.....	83
4.5.	Rosiglitazon und ED-1.....	86
4.6.	Rosiglitazon und CC3.....	87
4.7.	Rosiglitazon und der ADMA-Metabolismus.....	91
4.8.	Rosiglitazon und SMDA.....	99
4.9.	Das L-Arginin-Paradox.....	101
4.10.	Ausblick.....	102
5.	Zusammenfassung.....	104
5.	Summary.....	106
6.	Literaturverzeichnis.....	109

Abbildungsverzeichnis

Abbildungen

- Abb. 1, Seite 4: Einteilung des akuten Nierenversagens nach Lameire2005c
- Abb. 2, Seite 7: Pathophysiologie des akuten Nierenversagens nach Bonventre2003
- Abb. 3, Seite 10: Steigerung von Apoptose und Nekrose durch Peroxynitrit nach Pacher2007
- Abb. 4, Seite 11: Schematische Darstellung der NO-Synthase Funktion nach Förstermann2006
- Abb. 5, Seite 14: Regulation von iNOS und eNOS sowie deren Effekte im ischämischen akuten Nierenversagen
- Abb. 6, Seite 16: ADMA-Metabolismus nach Kielstein2009
- Abb. 7, Seite 17: Einflussfaktoren der eNOS-Entkopplung modifiziert nach Förstermann2006
- Abb. 8, Seite 17: circulus vitiosus zwischen ADMA und eNOS Entkopplung modifiziert aus Sydow 2003
- Abb. 9, Seite 19: Metabolismus von SDMA aus Kielstein2009
- Abb. 10, Seite 21: Erklärungen für das L-Arginin-Paradox
- Abb. 11, Seite 23: Einschränkung der NO-Produktion anhand des Verhältnisses der L-Arginin/ADMA Serumkonzentration aus Tsikas2000
- Abb. 12, Seite 23: Einschränkung der NO-Produktion anhand des intrazellulären Verhältnisses der Konzentration ADMA/L-Arginin aus Cardounel2007
- Abb. 13, Seite 25: Molekularer Wirkmechanismus der PPAR γ -Agonisten aus Yki-Jaervinen2004

- Abb. 14, Seite 40: Inulin-Clearance der Gruppen Kontrolle, Sham+NaCl, Sham+Rosiglitazon, Clamp+NaCl und Clamp+Rosiglitazon
- Abb. 15, Seite 41: PAH-Clearance der Gruppen Kontrolle, Sham+NaCl, Sham+Rosiglitazon, Clamp+NaCl und Clamp+Rosiglitazon
- Abb. 16, Seite 42: PAH-Nettosekretion der Gruppen Kontrolle, Sham+NaCl, Sham+Rosiglitazon, Clamp+NaCl und Clamp+Rosiglitazon
- Abb. 17, Seite 44: Expression der phosphorylierten eNOS Ser1177 der Gruppen Kontrolle, Sham+NaCl, Sham+Rosiglitazon, Clamp+NaCl und Clamp+Rosiglitazon
- Abb. 18, Seite 45: Expression der phosphorylierten eNOS Ser635 der Gruppen Kontrolle, Sham+NaCl, Sham+Rosiglitazon, Clamp+NaCl und Clamp+Rosiglitazon
- Abb. 19, Seite 47: Expression von phosphoryliertem Akt Ser473 der Gruppen Kontrolle, Sham+NaCl, Sham+Rosiglitazon, Clamp+NaCl und Clamp+Rosiglitazon
- Abb. 20, Seite 49: Expression der eNOS-mRNA der Gruppen Kontrolle, Sham+NaCl, Sham+Rosiglitazon, Clamp+NaCl und Clamp+Rosiglitazon
- Abb. 21, Seite 51: Expression der iNOS-mRNA der Gruppen Kontrolle, Sham+NaCl, Sham+Rosiglitazon, Clamp+NaCl und Clamp+Rosiglitazon
- Abb. 22, Seite 53: Anzahl der ED-1 positiven Zellen pro μm^2 der Gruppen Kontrolle, Sham+NaCl, Sham+Rosiglitazon, Clamp+NaCl und Clamp+Rosiglitazon
- Abb. 23, Seite 54: Exemplarischer Western-Blot der CC3-Expression der Gruppen Kontrolle, Sham+NaCl, Sham+Rosiglitazon, Clamp+NaCl und Clamp+Rosiglitazon
- Abb. 24, Seite 55: Expression von Cleaved-Caspase 3 der Gruppen Kontrolle, Sham+NaCl, Sham+Rosiglitazon, Clamp+NaCl und Clamp+Rosiglitazon

- Abb. 25, Seite 58: Serumspiegel von ADMA der Gruppen Kontrolle, Sham+NaCl, Sham+Rosiglitazon, Clamp+NaCl und Clamp+Rosiglitazon
- Abb. 26, Seite 59: Expression PRMT 1 der Gruppen Kontrolle, Sham+NaCl, Sham+Rosiglitazon, Clamp+NaCl und Clamp+Rosiglitazon
- Abb. 27, Seite 60: Expression DDAH 2 der Gruppen Kontrolle, Sham+NaCl, Sham+Rosiglitazon, Clamp+NaCl und Clamp+Rosiglitazon
- Abb. 28, Seite 61: Expression DDAH 1 der Gruppen Kontrolle, Sham+NaCl, Sham+Rosiglitazon, Clamp+NaCl und Clamp+Rosiglitazon
- Abb. 29, Seite 63: Serumspiegel von L-Arginin der Gruppen Kontrolle, Sham+NaCl, Sham+Rosiglitazon, Clamp+NaCl und Clamp+Rosiglitazon
- Abb. 30, Seite 64: Der Quotient aus L-Arginin und ADMA der Gruppen Kontrolle, Sham+NaCl, Sham+Rosiglitazon, Clamp+NaCl und Clamp+Rosiglitazon
- Abb. 31, Seite 67: Serumspiegel von SDMA der Gruppen Kontrolle, Sham+NaCl, Sham+Rosiglitazon, Clamp+NaCl und Clamp+Rosiglitazon
- Abb. 32, Seite 75: Einflussmöglichkeiten der PPAR γ -Agonisten auf eNOS und die endotheliale NO-Freisetzung nach Hwang2005
- Abb. 33, Seite 83: Zusammenhang zwischen iNOS und der Entkopplung von eNOS modifiziert nach Foerstermann2006
- Abb. 34, Seite 92: circulus vitiosus zwischen ADMA und eNOS Entkopplung modifiziert nach Sydow 2003
- Abb. 35, Seite 95: ADMA / L-Arginin / DDAH im akuten Nierenversagen
- Abb. 36, Seite 100: SDMA und Rosiglitazon im akuten Nierenversagen

Tabellen

- Tab. 1, Seite 2: Vergleichende Darstellung der RIFLE- und AKIN-Einteilung nach Bellomo2004b und Mehta2007a
- Tab. 2, Seite 36: verwendete Antikörper im Western-Blot
- Tab. 3, Seite 65: Der Quotient, „standard error of the mean“ (SEM), \log_{10} aus den Serumkonzentration von L-Arginin und ADMA der Gruppen Kontrolle, Sham+NaCl, Sham+Rosiglitazon, Clamp+NaCl und Clamp+Rosiglitazon 24 Stunden nach der Erstoperation, mit $n=10$. Außerdem die errechnete NO-Produktion anhand der Formel: $(\log([L\text{-Arginin}]/[ADMA]) * 48,97) + 1,19620 = \text{NO-Produktion in \%}$ (Tsikas2000)
- Tab. 4, Seite 80: Einfluss von PPAR γ -Agonisten auf die Expression von eNOS in verschiedenen Versuchsmodellen

Abkürzungen

ADMA	Asymmetrische Dimethylarginin
(i)ANV	(ischämisches) akutes Nierenversagen
ATN	Akute tubuläre Nekrose
ATP	Adenosintriphosphat
BH ₄	Tetrahydrobiopterin
CC3	Cleaved caspase 3
GFR	Glomeruläre Filtrationsrate
GMP	Guaninmonophosphat
cGMP	Zyklisches Guanosinmonophosphat
DDAH	Dimethylarginindiaminohydrolase
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
NAD(P)[H]	Nikotinamidadenindinukleotid(phosphat)[hydroxid]
NO	Stickstoffmonoxid
(p-)eNOS	(phosphorylierte) Endotheliale Stickoxidsynthase
iNOS	Induzierbare Stickoxidsynthase
nNOS	Neuronale Stickoxidsynthase
O ₂ ⁻	Hyperoxid
ONOO ⁻	Peroxynitrit
PAH	para-Aminohippursäure
PARP	Poly-Adenosindiphosphat-Ribose-Polymerase
PRMT	Proteinargininmethyltransferase
PPAR γ	Peroxisome-proliferator activated receptor γ
RGZ	Rosiglitazon
ROS	Reactive Oxygen Species
RPF	Renaler Plasmafluss
SDMA	Symmetrisches Dimethylarginin
sGC	Lösliche Guanylylzyklase
Ser	Serine
SOD	Superoxiddismutase

1. Einleitung

1.1. Das akute Nierenversagen

1.1.1. Terminologie

Unter dem klinischen Begriff des akuten Nierenversagens versteht man eine Verschlechterung der Nierenfunktion bis hin zu deren kompletten Ausfall. Im Gegensatz zum chronischen Nierenversagen, das durch den andauernd schlechten Status charakterisiert ist, entwickelt sich das akute Nierenversagen schnell und ist meist reversibel.

Klinisch dominieren zwei Komponenten: Zum einen kommt es in über $\frac{3}{4}$ der Fälle zu einem Abfall der glomerulären Filtrationsfraktion, was sich in einer Oligo- (<500ml/d) bis Anurie (<200ml/d) widerspiegelt. Zum anderen kommt es durch die fehlende Filtration und Rückresorption zu Störungen des Elektrolyt- und Säure-Base-Haushaltes sowie zur Akkumulation von urämisch-toxischen Metaboliten und Endprodukten wie Harnstoff oder Harnsäure. Der Serumspiegel von Kreatinin gilt hierbei als Maß für die Filtrationsleistung der Niere.

Im Rahmen einer Konsensuskonferenz von 2004 wurden die Stadien des akuten Nierenversagens entsprechend dieser beiden Messkriterien (Kreatininanstieg/Urinexkretion) neu definiert: RIFLE (Risk-Injury-Failure-Loss-End-stage-renal-disease) (Bellomo2004b, Tabelle 1). Ziel war es, bessere Prognosen hinsichtlich Dialysepflicht oder Mortalität treffen zu können. Neue Studien belegen, dass auch geringe Einschränkungen der Nierenfunktion die Langzeitprognose hospitalisierter Patienten beeinflussen (Hoste2007; Ricci2008). 2007 wurden die Kriterien eingegrenzt. Der Begriff des akuten Nierenversagens wurde durch den allgemeineren Begriff der akuten Nierenschädigung (AKI-acute kidney injury) ersetzt (Mehta2007a, Tabelle 1). Die Hauptunterschiede zwischen RIFLE und AKI bestehen darin, dass AKI auf die chronifizierenden Stadien „L“ und „E“ verzichtet und außerdem eine zeitliche Komponente von 48 Stunden für die beschriebenen Funktionsänderungen einführt (Tabelle 1).

Definition der akuten Nierenschädigung durch das Acute Kidney Injury Network (AKIN-Definition)

Abrupte (innerhalb von 48 Stunden) Abnahme der Nierenfunktion, definiert durch

- einen absoluten Anstieg des Serum-Kreatinins $\geq 0,3$ mg/dl ($\geq 26,4$ μ mol/l),
- einen prozentualen Anstieg des Serum-Kreatinins ≥ 50 % (das 1,5-fache des Ausgangswertes) oder
- eine Verminderung der Urin-Ausscheidung $< 0,5$ ml/kg/h über mehr als 6 Stunden.

Stadieneinteilung der akuten Nierenschädigung

RIFLE-Stadium	AKIN-Stadium	Serum-Kreatinin	Urin-Ausscheidung
Risk	1	1,5- bis 2-facher Kreatininanstieg (RIFLE/AKIN) oder Kreatininanstieg $\geq 0,3$ mg/dl (AKIN)	$< 0,5$ ml/kg/h für 6 h
Injury	2	2- bis 3-facher Kreatininanstieg	$< 0,5$ ml/kg/h für 12 h
Failure	3	> 3 -facher Kreatininanstieg oder Serum-Kreatinin > 4 mg/dl mit einem akuten Anstieg $\geq 0,5$ mg/dl	$< 0,3$ ml/kg/h für 24 h oder fehlende Urinausscheidung (<u>Anurie</u>) für 12 h
Loss	*	Dauerhaftes Nierenversagen für > 4 Wochen	
ESRD	*	Dauerhaftes Nierenversagen für > 3 Monate	

*) Die RIFLE-Stadien „Loss“ und „ESRD“ werden als Spätfolgen der akuten Nierenschädigung in der AKIN-Stadieneinteilung nicht mehr berücksichtigt

Tab. 1: Vergleichende Darstellung der RIFLE- und AKIN-Einteilung nach Bellomo2004b und Mehta2007a

1.1.2. Einteilung

Die Einteilung des akuten Nierenversagens erfolgt unter ätiologischen Gesichtspunkten.

Das prärenale Nierenversagen ist durch eine primäre Störung der Perfusion des Nierengewebes aufgrund von Zirkulationsstörungen, Volumenmangel oder toxischer Einflüsse gekennzeichnet.

Das intrarenale Nierenversagen hat eine direkte Schädigung des Nierengewebes zur Ursache. Dies kann Folge regionaler Zirkulationsstörungen, die häufig durch Vaskulitiden oder Cholesterinembolien verursacht werden, aber auch Folge einer globalen prärenalen Einschränkung der Zirkulation sein (Fischer2008). Die Immunologie mit den zahlreichen Formen der Glomerulonephritis und die Infektiologie mit HIV oder HANTA erweitern das Spektrum der möglichen Ursachen des akuten Nierenversagens (Lameire2005c). Schließlich sind auch toxische Elemente wie Medikamente, Röntgenkontrastmittel, die Proteinausfällungen beim multiplen Myelom und bei der Rhabdomyolyse oder Endothelschädigungen des hämolytisch-urämischen Syndroms bzw. der thrombotisch-thrombozytopenischen Purpura zu nennen (Fischer2008).

Das postrenale Nierenversagen beruht auf einem Harnstau aufgrund einer Obstruktion der ableitenden Harnwege durch Steine, Tumoren und Fibrosen oder aufgrund einer Blasenentleerungsstörung.

Die ischämische Nierenschädigung als Missverhältnis zwischen Sauerstoffangebot und -bedarf kann sowohl prärenal durch mangelnde Perfusion als auch intrarenal durch unzureichende Sauerstoffaufnahme in das Gewebe bedingt sein. Die im Tiermodell induzierte ischämische Nierenschädigung bildet den Ausgangspunkt dieser Arbeit.

Abbildung 1 fasst die verschiedenen Ätiologien des Nierenversagens graphisch zusammen.

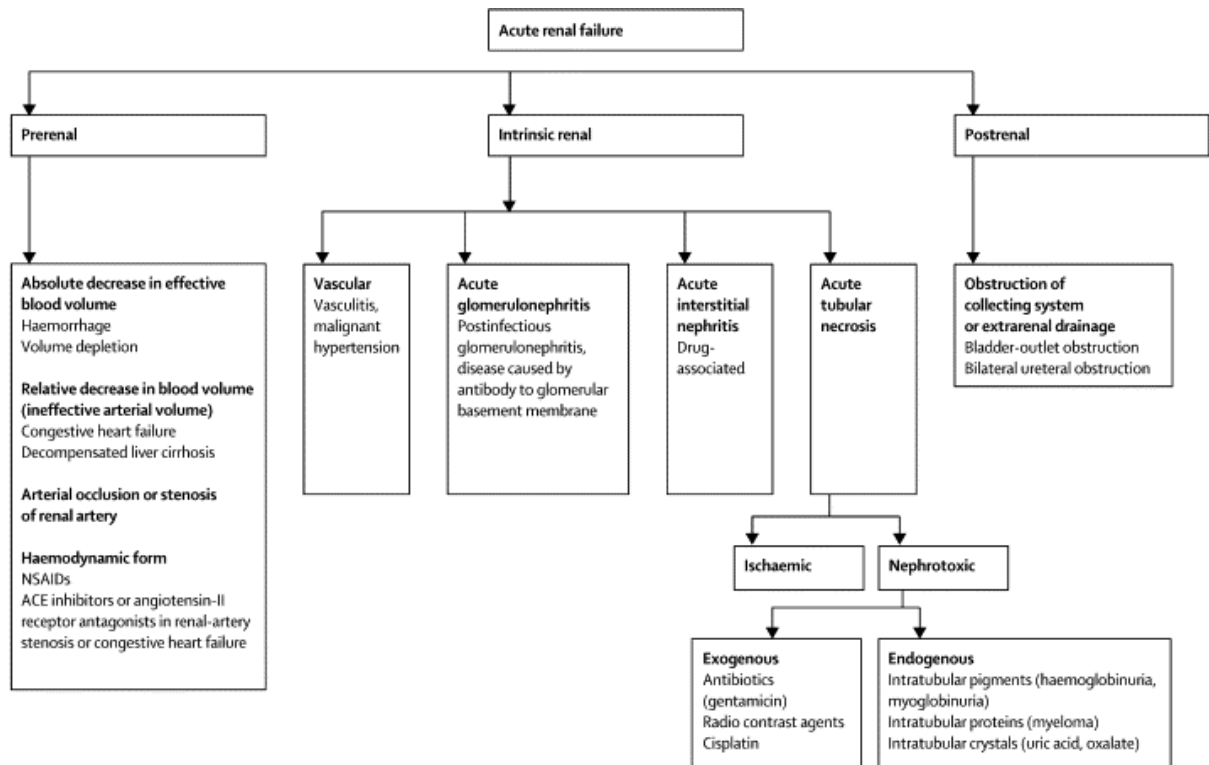


Abb. 1: Einteilung des akuten Nierenversagens (aus Lameire2005c)

1.1.3 Epidemiologie

Epidemiologische Studien auf Basis der RIFLE-Definition zeigen mit 1811 Fälle auf eine Million Einwohner eine weitaus höhere Inzidenz der akuten Nierenschädigung in der Bevölkerung als bisher angenommen (Ali2007). Weiterhin ist die Angabe der Inzidenz der akuten Nierenschädigung problematisch, weil der Ausgangswert des Kreatinins in der Regel unbekannt ist (Zappitelli2008).

Die Inzidenz der akuten Nierenschädigung von Patienten auf Intensivstationen ist mit über 36% besonders hoch. Die Mortalitätsrate bei diesen Patienten beträgt über 50%. Die Hauptursachen der akuten Nierenschädigung bei Intensivpatienten sind prärenal (38,5%) (Cruz2007).

Die akute Nierenschädigung ist nicht nur eine häufige Komplikation der Grunderkrankung sondern verschlechtert meist auch deren Prognose (Hoste2007). Oft kommt es zu einer prolongierten renalen Dysfunktion. Die akute Nierenschädigung ist in 5% aller Fälle irreversibel, bei älteren Patienten sogar in 16% (Fischer2008).

1.1.4. Klinischer Verlauf

Der klinische Verlauf wird in vier Phasen eingeteilt. Die Induktions- oder Initialphase markiert den Beginn der Schädigung. Während Parameter wie Filtrationsrate oder Durchblutung bereits verändert sind, zeigen sich noch keine Symptome.

Für die folgende Erhaltungsphase ist die Oligurie kennzeichnend. Folgen sind ein Anstieg der Retentionswerte. Sie kann Tage bis Wochen dauern und sich klinisch durch eine hydropische Dekompensation, Elektrolytstörung oder urämische Symptome äußern.

Die polyurische Erholungsphase hingegen dauert meist wenige Tage. Ausscheidungsraten von mehr als 4l/d sind typisch, da die glomeruläre Filtrationsfunktion meist deutlich vor der tubulären Resorptionsfähigkeit einsetzt.

Die anschließende Restitutionsphase kann nach Wochen bis Monaten zu einer völligen Wiederherstellung der Nierenfunktion führen.

1.1.5. Pathophysiologie des ischämischen Nierenversagens

Das ischämisch bedingte akute Nierenversagen wird auch als vasomotorische Nephropathie bezeichnet, da in der post-ischämischen Niere eine deutliche Einschränkung der Gefäßrelaxation vorliegt (Bonventre2003).

Wesentliches Merkmal ist eine Verringerung der glomerulären Filtrationsrate (GFR). Diese wird einerseits auf die ischämische Minderperfusion zurückgeführt, zum andern wird durch die tubuloglomeruläre Rückkopplung eine Vasokonstriktion verursacht.

Die Aktivierung des Rückkopplungsmechanismus wird durch eine verminderte Salzresorption verursacht. Ursachen dieser verminderten Resorption ist der Verlust der Zellpolarität im proximalen Tubulus, was eine Verschiebung der Na^+/K^+ -ATPase und eine Abnahme von tight-junction Zellverbindungen zur Folge hat (Bonventre2003).

Neben der Schädigung durch die „global“ erniedrigte Blutzufuhr ist der Hauptauslöser des postischämischen Gewebsuntergangs die regionale Einschränkung der Durchblutung. Besonders betroffen hiervon ist die äußere

Medulla (Bonventre2003), die geringer mit Blut versorgt wird als der Cortex. Zellschäden, die durch die primäre Hypoxie (Initialphase) ausgelöst werden, führen zu einer Zellschwellung und Expression von Adhäsionsmolekülen. In der Erhaltungsphase binden Leukozyten, die durch Radikale Sauerstoffmoleküle (ROS), Eicosanoide, Chemokine oder Komplementfaktoren aktiviert wurden, an geschädigte Endothelzellen. Es kommt zu einem Entzündungsprozess mit Zellnekrose, was zu weiteren Schäden an Zellen und Leukozyten führt. Folge ist die Freisetzung vasoaktiver Entzündungsmediatoren wie Endothelin, Thromboxane A₂, Leukotriene und eine erhöhte Sympathikusaktivität.

Die Produktion von endothelialelem NO mit seinen vasodilatatorischen und entzündungshemmenden Eigenschaften wird durch den Verlust an Endothelzellen vermindert (Bonventre2003). Abgestorbene Zellen führen über eine tubuläre Obstruktion zu einer weiteren Schädigung. Subletal geschädigte Zellen weisen einen Verlust des Aktin-Cytoskeletts (Fischer2008) und der Mikrovilli auf. Folgen sind ein Verlust der Zellpolarität (Fischer2008) und der Na⁺/K⁺-Kanal-Ausrichtung, ein Verlust von Zellverbindungen und eine Loslösung der Zellen von der Basalmembran. In Kombination mit dem durch Obstruktion erhöhten intraluminalen Druck kommt es zum parazellulären Übertritt des Filtrats in das peritubuläre Interstitium, was als „back-leak“ bezeichnet wird und die Entzündungsreaktion verstärkt (Fischer2008). Auch zeigt sich die Expression verschiedener Transportproteine reduziert (Bonventre2003).

In der Erholungsphase werden weite Teile des Gewebes wieder normal durchblutet. Allerdings setzen sich der Entzündungsvorgang und damit der Zellschaden und Zellverlust vor allem in den schlecht perfundierten Bereichen der äußeren Medulla fort.

Die Zellnekrose wird durch die einsetzende Reperfusion noch beschleunigt: Durch die Reperfusion werden Glycine wegschwemmt, die die Öffnung eines sogenannten „Todeskanals“ von bisher noch nicht geschädigten Zellen verhindert hatten. Dieser „Todeskanal“ wird während der Ischämie intrazellulär durch den Verbrauch des ATP aktiviert und durch eine Entfernung der extrazellulären blockierenden Glycine geöffnet. (Bonventre2003).

In der Abbildung 2 werden die pathophysiologischen Mechanismen des ischämischen akuten Nierenversagens zusammengefasst. Es erfolgt eine Unterteilung in eine hypoxisch/vasokonstriktorische Komponente auf Ebene der Glomeruli und eine inflammatorisch/zytotoxische Komponente auf Ebene der Tubuluszellen, wobei sich beide Ebenen gegenseitig bedingen und verstärken (Abbildung 2).

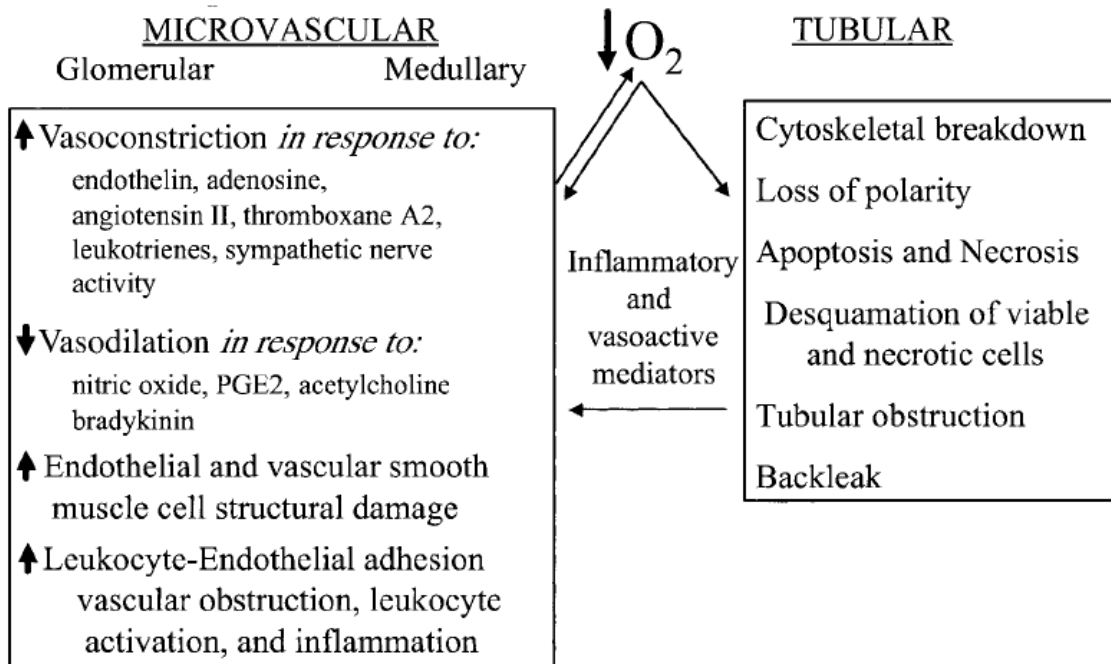


Abb. 2: Pathophysiologie des akuten Nierenversagens aus (Bonventre2003)

1.1.6. Therapie

Während bei der Aufklärung pathophysiologischer Vorgänge des akuten Nierenversagens in den letzten Jahren große Fortschritte gemacht wurden, sind die therapeutischen Möglichkeiten immer noch begrenzt. Neben der Prävention bildet die Aufrechterhaltung einer adäquaten Perfusion durch Optimierung des Volumenstatus den Hauptansatzpunkt der Therapie. Die Vermeidung nephrotoxischer Medikamente ist obligat. Medikamente, die die renale Autoregulation stören, sollten zurückhaltend eingesetzt werden (Lameire2005c). Der Einsatz von Diuretika und Dopamin hat sich nach Auswertung mehrerer Metaanalysen trotz vielversprechender Ergebnisse im Tiermodell nicht bewährt (Fischer2008; Lameire2005c). Wichtige Faktoren im Rahmen der Behandlung sind das Erkennen und Behandeln von Störungen des Elektrolyt- und Säure-

Base-Haushaltes, die Behandlung von begleitenden Infektionen sowie die Anpassung der Medikamentendosierungen (Lameire2005c).

Um einen neuen Ansatz der Therapie des akuten Nierenversagens zu entwickeln, schien eine genauere Untersuchung des NO-Signalwegs sinnvoll. Dieser besitzt, wie in Kapitel 1.1.5. bereits angedeutet, eine zentrale Bedeutung im ischämischen akuten Nierenversagen: Das NO-Molekül ist sowohl an der hypoxisch-glomerulären Komponente als auch an der inflammatorisch-tubulären Komponente beteiligt. Allerdings spielt NO im ersten Schädigungsmechanismus eine protektive, in letzterem eine toxische Rolle (Bonventre2003). Hierbei scheint jeweils das produzierende Enzym, endotheliale oder induzierbare NO-Synthase, die Rolle von NO zu bestimmen (Goligorsky2002).

Im Folgenden soll nun der NO-Signalweg mit seinen verschiedenen Phosphorylierungsschritten sowie den NO-Synthasen beschrieben werden, einschließlich der Regulation im ischämischen akuten Nierenversagen.

1.2. Der NO-Stoffwechsel

1.2.1. NO - Stickstoffmonoxid

Stickstoffmonoxid ist ein bi-atomares und hochreaktives, farbloses Gas, das in eine Vielzahl biologischer Prozesse involviert ist.

Zum einen wirkt NO als Signalmolekül, da es aufgrund seiner Struktur frei durch die Kompartimente der Zelle diffundieren kann. Die Signaltransduktion wird größtenteils über die als NO-Rezeptor fungierende lösliche Guanylatcyclase (sGC) vermittelt. Dieses Enzym ermöglicht die Umwandlung von Guanyltriphosphat (GTP) zum cyclischen Guanylmonophosphat (cGMP) (Fenske2005). Das so entstandene cGMP wirkt als second messenger. Unter anderem wird durch dieses die cGMP-abhängige Proteinkinase vom Typ I (cGK I) aktiviert, die wiederum über Phosphorylierung das vasodilatatorstimulierende Phosphoprotein (VASP) in seine aktive Form überführt und den IP3-Rezeptor

stimuliert. Beides führt letztlich zur Gefäßrelaxation (Fenske2005, Freund2005, Fischer2008).

Ferner ist freies NO über sGC in der Lage, die Adhäsion von Thrombozyten und Monozyten an die Gefäßwand zu reduzieren, sowie die Gefäßpermeabilität herabzusetzen. Außerdem ist NO als Antioxidans wirksam (Fenske2005, Fischer2008).

Toxisch wirkt NO innerhalb der Transduktionskaskaden des Immunsystems im Rahmen einer Inflammationsreaktion. Hierbei entsteht nitrosativer Stress. Dieser geht nicht direkt auf NO zurück, sondern auf Peroxynitrit, das aus der Verbindung von NO und eines Hydroperoxydionradikals entsteht. Dieses Radikal wird in der akuten Inflammation vermehrt gebildet (Fischer2008, Abbildung 3).

Peroxynitrit selbst reagiert nur mit wenigen Molekülen (Pacher2007). Durch Dissoziation von Peroxynitrit entstehen hochaktive Hydroxyl (OH^\cdot) oder Carbonat (CO_3^\cdot)radikale zusammen mit Nitrogen Dioxid (NO_2^\cdot).

Diese hochreaktiven Radikale oxidieren Proteine. Als Beispiel seien die Oxidation und Inaktivierung sämtlicher Komplexe der mitochondrialen Atmungskette oder die Oxidation und Aktivierung der cytotoxischen Matrix Metalloproteinase (MMP) genannt (Abbildung 3).

Außerdem werden membranständige Lipide oxidiert, was zu ihrer Degeneration führt. Dadurch entsteht eine Permeabilitätserhöhung der äußeren mitochondrialen Membran. Als Folge treten Signalmoleküle wie Cytochrom C in das Cytosol über, was eine Aktivierung des apoptotischen Caspase-Signalweges auslöst (Abbildung 3).

Schließlich kommt es zu oxidativen Modifikationen der Zell-DNA mit entsprechenden Schäden und Strangbrüchen. Eine Überexpression des PARP-Reparaturenzyms ist die Folge. Durch den gesteigerten Verbrauch an NAD⁺ kommt es zu einem ATP Mangel mit anschließendem Zelluntergang (Pacher2007, Abbildung 3).

Durch die Nitrierung von Proteinen wird deren Struktur verändert und damit ihre Funktion als Signalproteine oder als Enzyme eingeschränkt. So wurde eine nitrierte und damit inaktive mitochondriale Superoxid-Dismutase in

abgestoßenen Nierentransplantaten entdeckt (Pacher2007). Über eine Nitrierung der Phosphatidylinositol 3-Kinase wird der Akt-Signalweg (Pacher2007) inhibiert, dessen Aktivierung einen starken protektiven Mechanismus gegen die Apoptose unter Stressbedingungen darstellt.

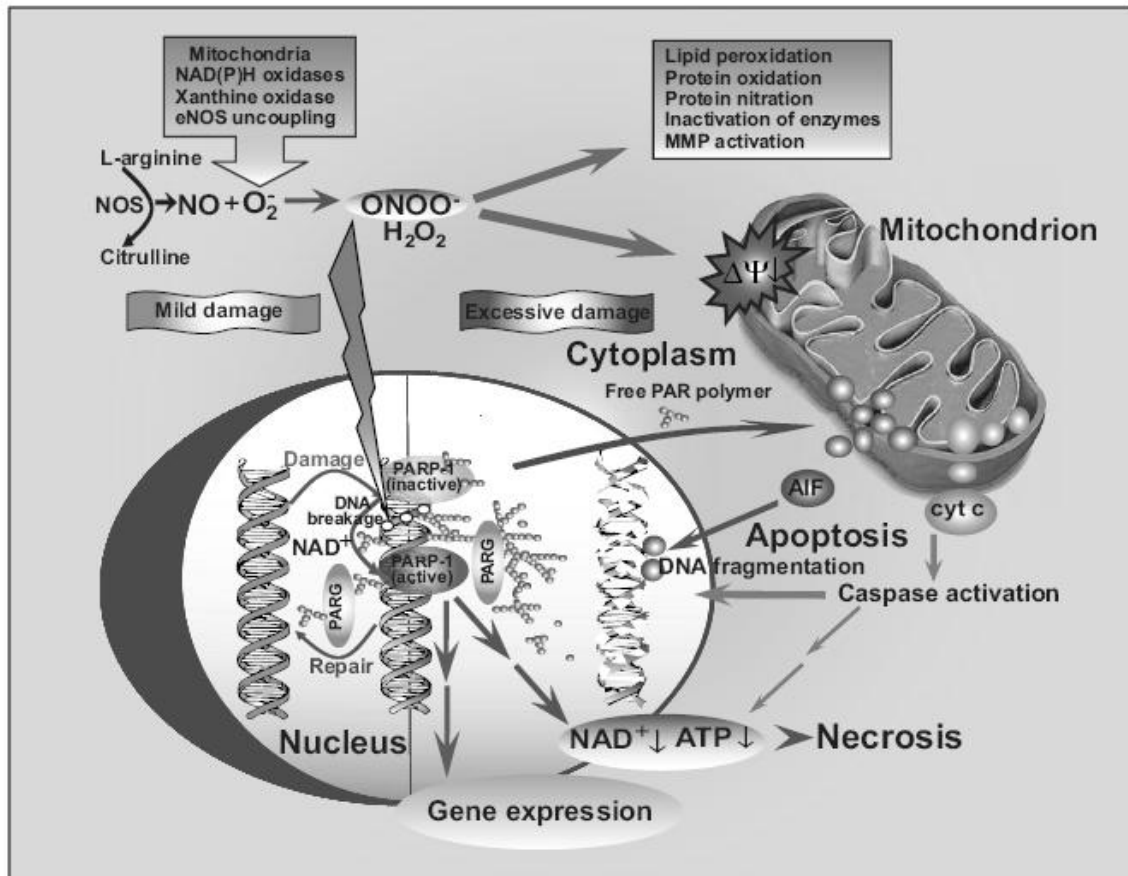


Abb. 3: Steigerung von Apoptose und Nekrose durch Peroxynitrit (Pacher2007)

1.2.2. Die NO-Synthase (NOS)

Die aktive NO-Synthase ist ein dimeres Molekül. Jeweils zwei Monomere bestehend aus einer Oxygenase- und einer Reduktase-Domäne sind über den Cofaktor Häm miteinander verbunden (Abbildung 4). Im Aufbau ist die C-terminale Reduktase-Domäne des einen Monomers mit der N-terminalen Oxygenase-Domäne des anderen Monomers verbunden (Foerstermann2006). Zusätzlich enthält die NOS ein Zink-Ion, das zentral in einer tetraedrischen Konformation der Monomere gelagert ist. Strukturell besitzt das Zink-Ion eine stabilisierende Funktion. Ebenfalls binden an dieser zentralen Stelle in

Interaktion mit dem Häm-Molekül der Kofaktor Tetrahydrobiopterin (BH₄), Sauerstoff und das Substrat L-Arginin (Foerstermann2006, Abbildung 4).

NOS katalysiert den Elektronentransfer von NADPH, das am C-Terminus gebunden ist, an das Häm-Molekül. Hierbei werden Flavin-Adenin-Dinukleotid (FAD) und Flavin-Adenin-Mononukleotid (FMN) als Kofaktoren benötigt (Fischer2008). Im nächsten Schritt wird O₂ reduziert und damit aktiviert. Um schließlich NO zu synthetisieren, wird L-Arginin mit Hilfe des Kofaktors BH₄ zu N-Hydroxy-L-Arginin hydroxyliert. Dieses bleibt überwiegend an das Enzym gebunden. Im Anschluss erfolgt die Oxygenierung von N-Hydroxy-L-arginin zu Citrullin und NO (Foerstermann2006, Abbildung 4).

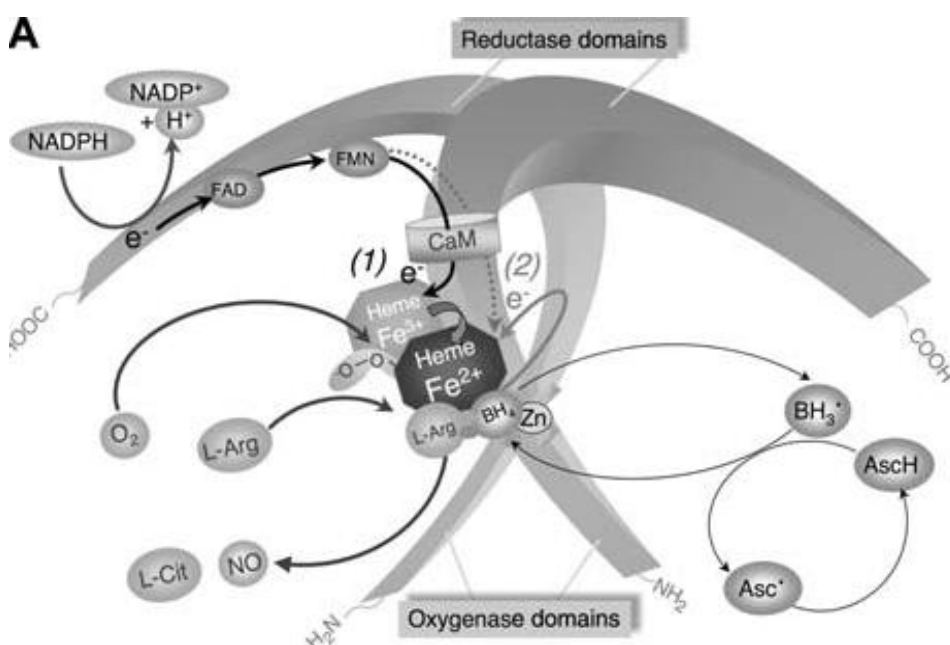


Abb. 4: Schematische Darstellung der NO-Synthase Funktion (aus Förstermann2006)

Es existieren drei NOS-Isoformen, von denen die endotheliale NOS (eNOS, NOS III) und die neuronale NOS (nNOS, NOS I) konstitutiv exprimiert werden, während die induzierbare NOS-Isoform (iNOS, NOS II) auf transkriptioneller Ebene induzierbar ist. Die Bildung von NO durch eNOS und nNOS wird durch Kalzium reguliert und ist unter physiologischen Bedingungen nicht vom extrazellulären L-Arginin-Angebot abhängig. Zelltypen, die die konstitutive NOS exprimieren, bilden kontinuierlich geringe Mengen NO. Das in Endothelzellen,

Kardiomyozyten und Blutplättchen durch eNOS entstehende NO reguliert den Gefäßtonus und hemmt Plättchenaggregation und Leukozytenadhäsion.

1.2.3. Neuronale NO-Synthase (nNOS)

nNOS wird überwiegend in Neuronen, in der Macula Densa und den efferenten Arteriolen der Niere exprimiert. nNOS ist an der Regulation der glomerulären Hämodynamik über die tubuloglomeruläre Rückkopplung und an der Freisetzung von Renin beteiligt (Goligorsky2002).

1.2.4. Endotheliale NO-Synthase (eNOS)

Die Produktion erfolgt Ca^{2+}/CaM -abhängig. Vermehrtes intrazelluläres Calcium führt zu einer verstärkten Bindung von Calmodulin M an eNOS, was eine autoinhibitorischen Konformation auflöst und den Elektronenfluss von NADPH in der Reduktase-Domäne zur Häm in der Oxygenase-Domäne fördert (Abbildung 4, Foerstermann2006).

Es sind verschiedene potentielle Phosphorylierungsstellen in der eNOS bekannt. Am besten charakterisiert ist die Phosphorylisierung der Ser1177 (Ratte-eNOS: 1179) in der Reduktase-Domäne und an Thr495 in der Calmodulin M bindenden Domäne.

Ausgelöst wird die Phosphorylierung an Ser1177 durch Signalmoleküle wie den vaskulären endothelialen Wachstumsfaktor (Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)), Östrogen oder durch Dehnungsstress (Boo2002). Letzterer wirkt über die Aktivierung der Proteinkinase A (PKA), wohingegen Östrogen und VEGF über den Akt/Proteinkinase B Signalweg wirken (Boo2002). Insulin aktiviert Akt und AMPK (AMP aktivierte Proteinkinase A, Boo2002). Die Phosphorylierung stimuliert den Elektronenfluss, erhöht die Sensivität für Ca^{2+} und bewirkt damit eine erhöhte Enzymaktivität (Foerstermann2006).

Die durch die Proteinkinase C vermittelte Phosphorylierung an Thr495 reduziert die Enzymaktivität (Harris2004).

Weitere Einflussfaktoren auf die Aktivität von eNOS stellen das Expressionslevel, die zelluläre Kompartimentierung oder Protein-Protein-Interaktionen dar (Fischer2008).

Unter bestimmten Umständen kann es zu einer Entkopplung der eNOS kommen. In diesem Fall erfolgt zwar eine Reduktion der O_2 zu hochreagiblen Hydroperoxyanionen, allerdings erfolgt durch die Entkopplung, die an der Häm-Gruppe der Oxygenase-Domäne stattfindet, keine weitere Oxygenierung zu NO (Fischer2008).

Ein auslösender Faktor der Entkopplung ist ein Mangel des Kofaktors BH_4 (Tetrahydrobiopterin). Dieser wird im Rahmen von erhöhtem oxidativen Stress besonders durch Peroxynitrit zu BH_2 oxidiert. Auch ein Substratmangel an L-Arginin etwa durch erhöhte Arginase-Aktivität in Stresssituationen kann zu einer Entkopplung führen. Schließlich wird asymmetrisches Dimethylarginin (ADMA), das als kompetitiver Inhibitor der eNOS fungiert, für eine Entkopplung verantwortlich gemacht (Foerstermann2006).

1.2.5. Induzierbare NO-Synthase (iNOS)

iNOS wird in Makrophagen sowie renalen Mesangial- und Tubuluszellen durch inflammatorische Zytokine wie LPS, Interferon γ , Interleukin-1 und TNF-alpha induziert. Im Gegensatz zu den konstitutiven NOS-Isoformen produziert sie große Mengen NO und ist kalziumunabhängig. Aufgrund der hohen Syntheserate besteht, ebenfalls im Gegensatz zu den konstitutiven NOS-Isoformen, eine deutliche Abhängigkeit von der Konzentration an L-Arginin (Bachmann1994).

1.2.6. Regulation der NO-Synthasen im akuten Nierenversagen

Im ANV werden iNOS und eNOS als Gegenspieler angesehen: Das durch iNOS gebildete NO trägt durch Lipidperoxidation, DNA-Schäden, Induktion der Apoptoseprozesse und der Inflammationsreaktion zum tubulären Schaden bei. Das durch eNOS gebildete NO verringert die endotheliale Dysfunktion und steigert die globale und regionale Blutversorgung (Schrier2004).

Durch Versuche mit dem selektiven iNOS-Inhibitor L-N⁶-(1-Iminoethyl)-Lysin (L-Nil) konnte gezeigt werden, dass die Produkte der iNOS für die histologisch nachweisbaren Schäden der tubulären Epithelzellen verantwortlich sind (Fischer2008). Die bereits beschriebene Bildung von Peroxynitrit ($ONOO^-$) wird

für die durch iNOS hervorgerufenen Zellschäden verantwortlich gemacht. Außerdem übt iNOS einen inhibitorischen Einfluss auf eNOS aus (Heemskerk2009, Abbildung 5): Die hohe NO Produktion von iNOS supprimiert die Aktivität von eNOS (Schwartz1997). Diese Suppression kann durch selektive Inhibition von iNOS im akuten Nierenversagen komplett aufgehoben werden (Heemskerk2009).

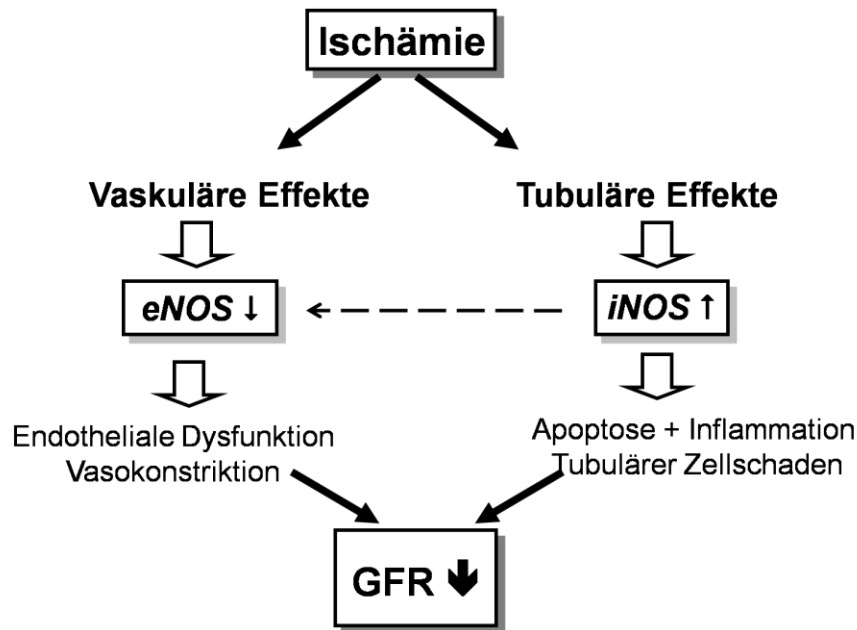


Abb. 5: Regulation von iNOS und eNOS sowie deren Effekte im ischämischen akuten Nierenversagen

Neben der Gesamtexpression und der Phosphorylierung kann die Aktivität der NO-Synthasen auch durch indirekte Faktoren beeinflusst werden: Diese umfassen einen Mangel an Co-Faktoren (Foerstermann2006) und die Methylarginine (Sydow2003). Hierbei handelt es sich um L-Arginin-Derivate, die einen inhibitorischen Einfluss auf den NO-Signalweg besitzen. Deshalb stellen auch Methylarginine einen potentiellen Ansatzpunkt dar, um über den NO-Signalweg den Ischämie-Reperfusionsschaden der Niere zu beeinflussen.

1.3. Methylarginine

1.3.1. ADMA

Das **A**symmetrische N^G, N^G -**D**i-**M**ethyl-L-**A**rginin (ADMA) stellt ein Derivat der Aminosäure Arginin dar. Es wurde 1970 erstmals von Kakimoto und Akazawa im Urin isoliert und charakterisiert (Kakimoto1970). Vallance et al.

(Vallance1992) zeigen, dass ADMA als kompetitiver Inhibitor der NO-Synthasen die Produktion von NO in vivo und in vitro senkt. Außerdem weisen sie einen erhöhten ADMA-Spiegel bei Patienten mit dialysepflichtigem chronischen Nierenversagen nach und folgern, dass aus einer Erhöhung des ADMA-Spiegels Hypertension und erhöhtes kardiovaskuläres Risiko resultieren könnten. Auch andere kardiovaskuläre Risikofaktoren wie LDL, Triglyceride, Homocystein und klinische Marker der kardiovaskulären Risikostratifizierung wie Intimadicke der A. carotis oder die Masse des linken Ventrikels sind mit erhöhten ADMA-Spiegeln assoziiert (Cooke2004, Zoccali2002, Zoccali2002a). Kohortenstudien in der allgemeinen Bevölkerung und bei Patienten mit terminalem Nierenversagen zeigen eine hohe Korrelation zwischen erhöhtem ADMA-Spiegel und der Mortalitätsrate bzw. der Rate kardiovaskulärer Ereignisse (Zoccali2001, Meinitzer2007).

Biochemisch inhibiert ADMA durch seine Strukturgleichheit zu L-Arginin (Tran2003) die endotheliale und die neuronale NO-Synthase, indem es mit dem Substrat L-Arginin um eine Bindung am katalytischen Zentrum der Synthase konkurriert (Palm2007). ADMA hat auf die induzierbare NO-Synthase eine geringere inhibitorische Wirkung (Palm2007). Außerdem beschleunigt ADMA die Attrition von Telomeren, vermindert die endotheliale Zellmotilität und die Differenzierung und Funktion endothelialer Progenitorzellen (Kielstein2008).

Zur Entstehung von ADMA wird der Arginin-Rest von Proteinen durch eine Protein-Arginin-Methyltransferase (PRMT) methyliert, die ubiquitär im Körper vorkommt. Nach Hydrolyse dieser Proteine wird ADMA freigesetzt. Als Donor fungiert hierbei S-Adenosylmethionin, das zu S-Adenosylhomocystein und dann zu Homocystein hydrolysiert wird (Tran2003). Es existieren verschiedene Gene, die für PRMT1-6 kodieren. PRMT wird in zwei verschiedene Isoformen unterteilt, die sich in ihrer Produktspezifität unterscheiden: Nur PRMT I, das PRMT1, 3, 4 und 6 umfasst bildet ADMA. PRMT1 ist hierbei die prädominante Form (Liu2008). PRMT II, das PRMT5 beinhaltet, bildet SDMA (Tran2003).

ADMA wird zu einem kleinen Teil durch renale Exkretion, zu einem größeren Teil durch metabolischen Abbau eliminiert. Als Schlüsselenzyme des metabolischen Abbaus fungieren Dimethylarginin-Dimethylaminohydrolasen

(DDAH). Diese ermöglichen die Hydrolyse von ADMA zu Dimethylarginin und L-Citrullin. DDAH existiert in den Isoformen I und II, die sich vor allem durch ihre Lokalisation differenzieren. DDAH I findet sich in Zellen, in denen nNOS stark exprimiert wird, wohingegen DDAH II eher mit eNOS assoziiert ist (Liu2008). DDAH I und II werden ubiquitär exprimiert, bevorzugt in Leber und Niere (Palm2007). DDAH wird sowohl in seiner Expression als auch in seiner Aktivität durch verschiedene Faktoren beeinflusst. Hierbei sind insbesondere die PPAR γ -Agonisten zu erwähnen, die die Expression steigern.

Der Einfluss von DDAH auf ADMA wurde am Mausmodell gezeigt: DDAH Knockout-Mäuse zeigten einen erhöhten ADMA-Spiegel mit erhöhtem vaskulärem Widerstand und Hypertonus, wohingegen Mäuse, die DDAH deutlich vermehrt exprimieren, einen niedrigeren ADMA-Spiegel mit einer geringeren Gefäßwanddicke und erhöhter Regenerationsfähigkeit des vaskulären Endothels aufweisen (Kielstein2008, Abbildung 6).

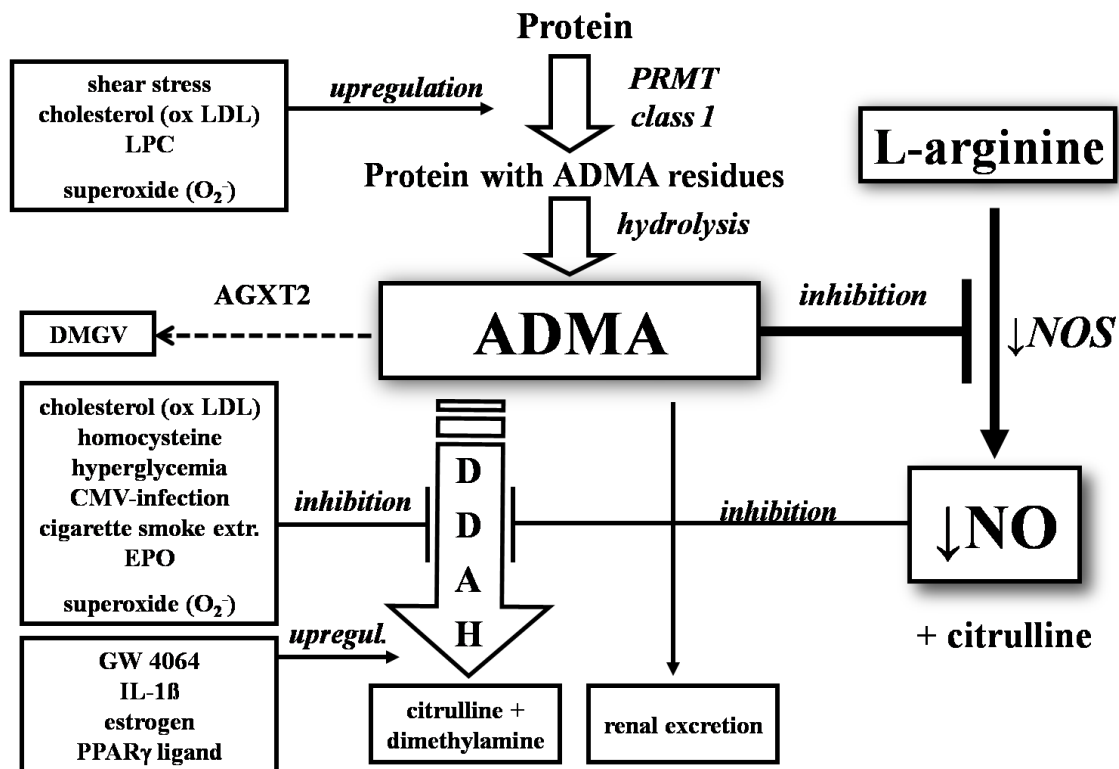


Abb. 6: Metabolismus von ADMA aus Kielstein2009

ADMA beeinflusst die NO Produktion durch zwei Mechanismen: Zum einen wird das eNOS-Enzym direkt gehemmt, was zu einer niedrigeren Aktivität führt. Zum

anderen gibt es Hinweise, dass hohe ADMA-Konzentrationen das eNOS-Enzym entkoppeln: Hierbei entsteht aus O_2 das Superoxid O_2^- . Dieses reagiert mit NO zu Peroxynitrit. Peroxynitrit reduziert den Cofaktor der eNOS Tetrahydrobiopterin (BH_4) zu dem inaktiven Dihydrobiopterin (BH_2). Dies führt zu weiterer eNOS-Entkopplung (Förstermann2006, Abbildung 7).

O_2^- erhöht die Expression von PRMT1 (Boeger2000) und hemmt die Aktivität von DDAH (Palm2007). Beides erhöht ADMA.

Hierdurch kommt es über eine gesteigerte eNOS-Entkopplung zu einer Anreicherung von O_2^- , was schließlich zu einem „circulus vitiosus“ führt (Sydow2003, Abbildung 8).

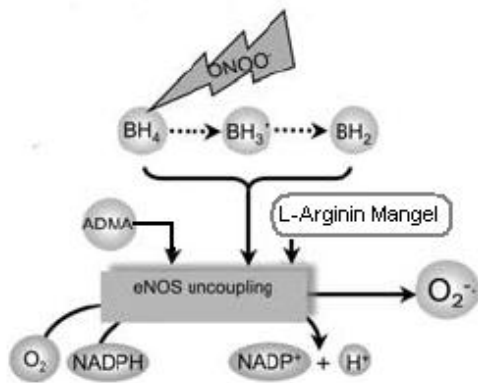


Abb. 7: Einflussfaktoren der eNOS-Entkopplung (modifiziert aus Förstermann2006)

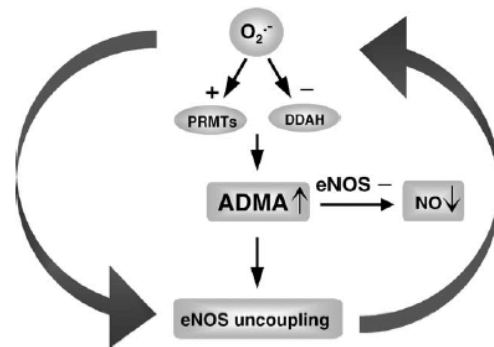


Abb. 8: circulus vitiosus zwischen ADMA und eNOS Entkopplung (modifiziert aus Sydow 2003)

Der transzelluläre Transport von ADMA wird durch kationische Aminosäure-Transporter (CAT) reguliert, die ebenso für den Transport von SDMA und L-Arginin verantwortlich sind (Palm2007).

Beim Menschen wurde eine erhöhte ADMA-Konzentration bei verschiedenen Krankheiten gefunden, die mit endothelialer Dysfunktion assoziiert sind wie Bluthochdruck, Hypercholesterinämie, Diabetes mellitus, chronische Herzinsuffizienz, Nikotinabusus und Niereninsuffizienz (Sydow2003).

Exogene Zufuhr von ADMA reduziert den renalen Blutfluss und mindert die Natriumrückresorption (Kielstein2009). ADMA-Spiegel steigen bei Patienten mit chronischer Nierenerkrankung bereits an, bevor es zum Abfall der glomerulären Filtrationsrate kommt (Kielstein2008). Erhöhte ADMA-Serumspiegel sind mit

einem Anstieg der Herzfrequenz, einem vermehrten systemische Widerstand und einem erhöhten Blutdruck assoziiert, aber mit einer Reduktion der zerebralen Perfusion (Kielstein2009).

Es existieren verschiedene Studien bezüglich therapeutischer Intervention zur Senkung des ADMA Spiegels. Der Versuch, den erhöhten ADMA-Spiegel durch die Gabe von L-Arginin zu senken, führte weder bei Patienten mit pAVK noch bei Patienten mit Niereninsuffizienz zu einem Erfolg (Kielstein2008).

1.3.2. SDMA

Das **S**ymmetrische N^G, N^G -**D**i-**M**ethyl-L-**A**rginin (SDMA) ist ein strukturelles Isomer zu ADMA. Wie ADMA entsteht es durch intranukleäre Methylierung von L-Arginin-Resten von Proteinen und wird nach deren Proteolyse ins Zytoplasma freigesetzt. Es wird unter Mitwirkung von PRMT 5 und 7 synthetisiert. Im Gegensatz zu ADMA wird SDMA nicht metabolisiert sondern überwiegend renal ausgeschieden. SDMA ist ein kompetitiver Inhibitor des L-Arginin-Transporters „y⁺ hCAT-2B“ und mindert somit die intrazelluläre Aufnahme von L-Arginin (Closs1997). Außerdem behindert es den L-Arginin-Uptake in der Henle-Schleife (Abbildung 9).

In Studien besteht eine gute Korrelation zwischen SDMA und der GFR, was SDMA zu einem guten endogenen Marker der Nierenfunktion macht (Kielstein2006). In Tieren erhöht eine fett- und cholesterinhaltige Diät den SDMA-Spiegel (Kielstein2006). Bei intensivpflichtigen Patienten korreliert SDMA sehr gut mit dem Sequential Organ Failure Assessment (SOFA) und ist ein Marker renaler und hepatischer Dysfunktion (Nijveldt2003a).

SDMA gilt als kombinierter Risikofaktor der renalen Dysfunktion und des Ausmaßes der KHK (Bode-Boeger2006).

In vitro hemmt SDMA die Synthese von NO. Dieser Effekt kann durch L-Arginin, nicht jedoch durch D-Arginin aufgehoben werden (Bode-Boeger2006).

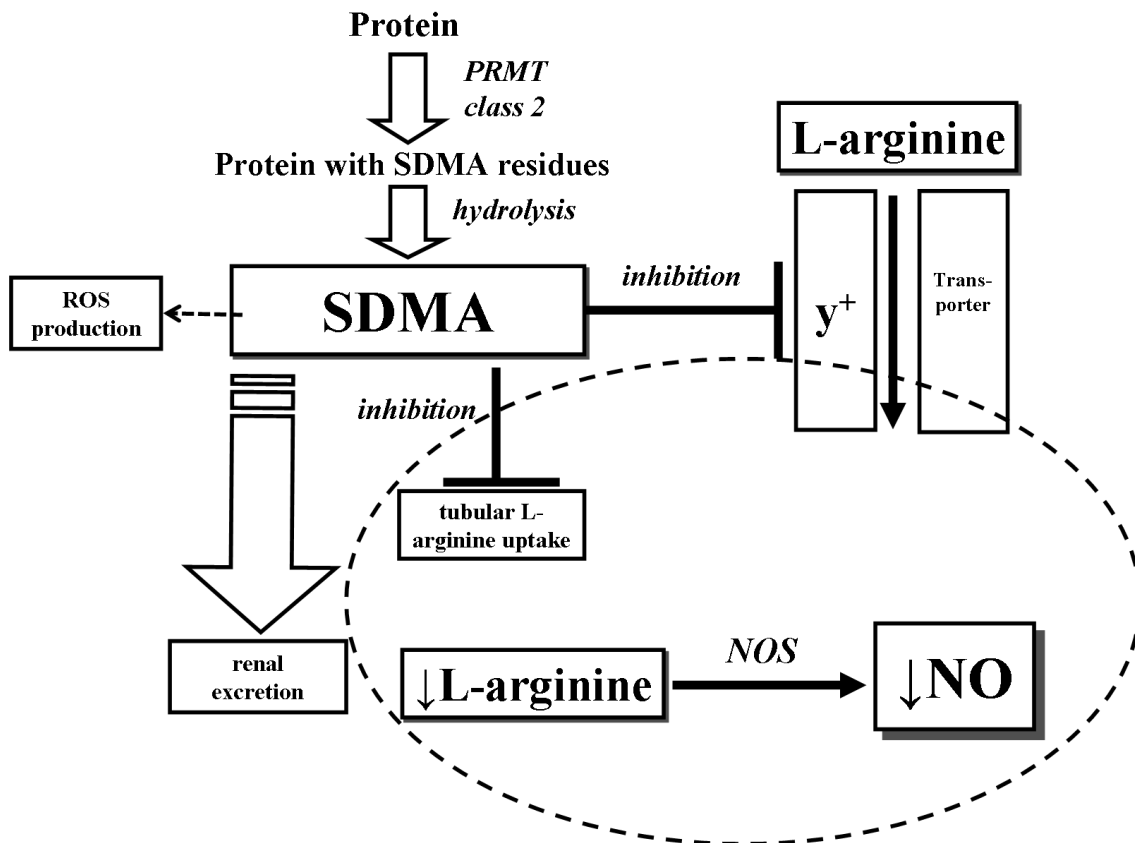


Abb. 9: Metabolismus von SDMA aus Kielstein2009

Bezüglich der Regulation und der pathophysiologischen Bedeutung von Methylarginin im akuten Nierenversagen existieren nur wenige Arbeiten: Carello et al. berichten von einem deutlichen SDMA- und einem geringen ADMA-Anstieg in bilateral nephrektomierten Ratten (Carello2006). Li Volti et al. zeigen, dass im Rattenmodell des Ischämie/Reperfusionsschadens der Niere der ADMA-Serumspiegel nach 3h Stunden auf dem Niveau der Kontrolltiere ist (Volti2008).

Ein indirekter Hinweis auf eine pathophysiologische Bedeutung von Methylargininen im akuten Nierenversagen stellt das „L-Arginin-Paradox“ dar. Dieses bei verschiedenen Krankheitsbildern vorkommende Phänomen wurde durch diese Arbeitsgruppe auch im akuten Nierenversagen nachgewiesen (Schneider2003; Schramm1994). Methylarginine spielen wahrscheinlich eine entscheidende Rolle bei der Entstehung dieses Phänomens (Boeger2004).

1.4. Das L-Arginin-Paradox

Schneider und Schramm zeigen (Schneider2003; Schramm1994), dass die Gabe von L-Arginin im ischämischen akuten Nierenversagen zu einer Funktionsverbesserung mit vermehrter NO-Produktion führt. Auch bei Patienten mit Hypercholesterinämie, Atherosklerose oder Diabetes mellitus II erwies sich die Gabe von L-Arginin als vorteilhaft bezüglich der NO-Produktion (Bode-Boeger2007).

Die Michealis-Menten-Konstante (K_m) für L-Arginin an der isolierten eNOS beträgt ca $3\mu\text{M}$ (Cardounel2007). Die normale Plasma-Konzentration von L-Arginin beträgt $100\mu\text{M}$, bei verschiedenen Krankheitsbildern kann sie bis auf $40\mu\text{M}$ absinken, wobei intrazelluläre Konzentrationen selten unter $200\mu\text{M}$ fallen (Leiper1999).

Diese Daten suggerieren, dass die exogene Gabe von L-Arginin keinen Einfluss auf die Aktivität von eNOS haben sollte, da bereits eine ausreichende Sättigungskonzentration. In vitro wurde diese Tatsache bestätigt, indem die Gabe von L-Arginin zu isolierten Aortenringen die endothel-abhängige Vasodilatation nicht besserte (Muegge1991b). Trotzdem führt in vivo die Gabe von L-Arginin bei verschiedenen Krankheitsbildern zu einer funktionellen Verbesserung. Dieser „paradoxe“ Umstand wird als „L-Arginin-Paradox“ bezeichnet (Boeger2004).

Es werden verschiedene Erklärungsmöglichkeiten für dieses Phänomen diskutiert (Abbildung 10):

1. Durch eine kompetitive Hemmung des zellulären γ^+ -Transportersystems durch Substanzen, die durch das gleiche System transportiert werden, könnte es zu einem intrazellulären Mangel an L-Arginin kommen, der nur durch die exogene Gabe mit entsprechenden extrazellulären Konzentrationsanstieg von L-Arginin überwunden werden kann. So werden Methylarginine durch dasselbe Transportsystem in die Zelle transportiert. ADMA besitzt eine deutlich höhere Affinität zu dem Transportsystem als L-Arginin, allerdings sind die Serum-Konzentrationen von ADMA in vivo nicht ausreichend für eine effektive kompetitive Blockade des Transportsystems (Closs1997, Bode-Boeger2007).

2. Als weitere mögliche Ursache wurden subzelluläre Kompartments des L-Arginin-Pools mit einer niedrigen Konzentration in der Nähe von eNOS beschrieben (McDonald1997). In einem Mikrokompartiment kommt es so zu einem raschen Verbrauch von L-Arginin durch eNOS. Das Enzym eNOS weist eine enge Co-Lokalisation mit dem kationischen Aminosäuretransporter „y⁺/CAT I“ auf (McDonald1997). Aus diesem Grund könnte ein Anstieg des Serum-L-Arginins über diesen Transporter zu einem schnellen Ausgleich des relativen intrazellulären Mangels an eNOS führen (Bode-Boeger2007).

3. Als dritte Erklärungsmöglichkeit wird vorgeschlagen, dass es durch den Inhibitor ADMA zu einer direkten Blockade des eNOS-Enzyms mit Minderung der NO-Produktion kommt. Diese kompetitive Inhibierung könnte nur durch einen deutlichen intrazellulären Überschuss an L-Arginin nach exogener Supplementation überwunden werden, wobei ADMA an der Bindungsstelle des Enzyms verdrängt wird (Bode-Boeger2007, Boeger2004, Tsikas2000).

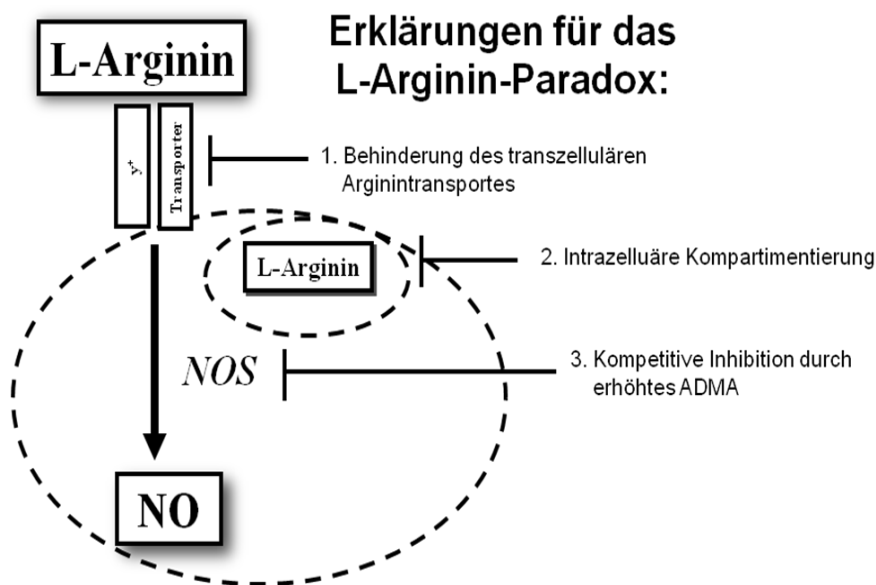


Abb. 10:
Erklärungen
für das
L-Arginin-
Paradox

Die dritte und letzte Erklärung scheint nur plausibel, falls folgende Voraussetzung vorliegt:

Der ADMA-Spiegel erreicht eine relevante Konzentration, um die NO-Synthese signifikant zu hemmen.

Wie bereits dargelegt liegt ein erhöhter Serum-ADMA Spiegel in verschiedenen Krankheitsbildern unter anderem auch dem chronischen Nierenversagen vor (Bode-Boeger2007). Da ADMA zum Teil renal ausgeschieden wird (Bode-

Boeger2007), ist ein erhöhter Serumspiegel bei eingeschränkter Nierenfunktion wahrscheinlich.

In vitro und in vivo Studien zeigen, dass ein extrazellulärer Anstieg der ADMA-Konzentration zu einem intrazellulären Anstieg von der ADMA-Konzentration führt (Kohli2004, Cardounel2007).

Die mittlere inhibitorische Konzentration (IC_{50}), d.h. die Konzentration, bei der eine halbmaximale Inhibition beobachtet wird, liegt bei ADMA am isolierten eNOS-Enzym bei ca 3,9 μ mol/L (Boeger2004). Im Homogenisat des Rattenhirns wurde die IC_{50} von ADMA mit 1,8 μ mol/L angegeben, an isolierten Aortaringen reicht die IC_{50} je nach Studie von 3 μ mol/L bis 15 μ mol/L (Boeger2004). Die intrazelluläre ADMA-Konzentration bei Normaltieren beträgt je nach Arbeit zwischen 4,7 μ M (Endothelzelle, Ratte) (Kohli2004), 3,6 μ M (Endothelzelle, Ratte) (Cardounel2007), 1,5 μ M (Nierenhomogenisat, Ratte) (Volti2008) bzw. 5 μ M (Endothelzelle, Hase) (Tsikas2000). Diese Schwankungen sind neben dem Organsystem/Zelltyp auch auf verschiedene Messverfahren zurückzuführen, wobei die Serumkonzentration von ADMA im Blut als Referenzwert dienen kann. Setzt man diesen auf 0,8 μ M so scheint eine intrazelluläre ADMA-Konzentration zwischen 3-5 μ M wahrscheinlich. Dies bedeutet, dass der IC_{50} intrazellulär schon in Normaltieren erreicht wird.

Eine effektive Minderung der NO-Produktion durch ADMA wird allerdings erst ab einer intrazellulären Konzentration von mindestens 8-10 μ M bewirkt. Dies ist darauf zurückzuführen, dass IC_{50} abhängig ist von der Inhibitionskonstanten (K_i), die ein Maß der Affinität des Inhibitors zu dem Enzym darstellt, sowie von der Michaelis-Menten-Konstanten (K_M) und der Konzentration des Substrates:

$$IC_{50} = \left[1 + \frac{[Substrat]}{K_m} \right] \times K_i$$

K_i von ADMA beträgt am isolierten eNOS-Enzym je nach Studie 0,4 μ M bis 0,9 μ M. (Cardounel2007, Tsikas2000).

Die Reduktion der NO-Produktion kann ein Maß für die inhibitorischen Wirkung von ADMA sein. Zur Berechnung der NO-Produktion stehen in Abhängigkeit zur Konzentration von ADMA und L-Arginin entsprechende Graphen zur Verfügung. Hierbei bezieht sich die Metaanalyse von Tsikas et al. auf den extrazellulären

ADMA/L-Arginin Quotienten (Tsikas2000, Abbildung 11), die Arbeit von Cardounel et al. auf den intrazellulären L-Arginin/ADMA Quotienten (Cardounel2007, Abbildung 12).

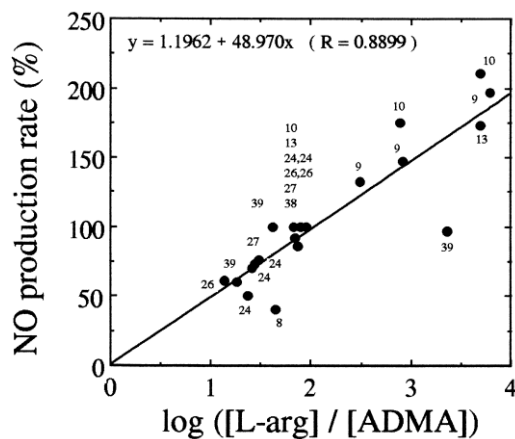


Abb. 11: Einschränkung der NO-Produktion anhand des Verhältnisses der L-Arginin/ADMA Serumkonzentration aus Tsikas2000

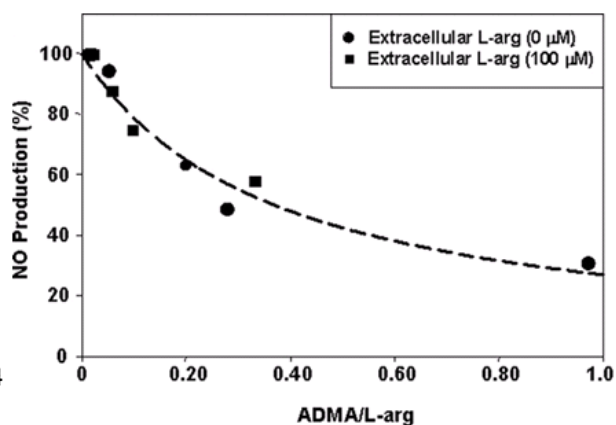


Abb. 12: Einschränkung der NO-Produktion anhand des intrazellulären Verhältnisses der Konzentration ADMA/L-Arginin aus Cardounel2007

Zusammenfassend aus den vorhergehenden Kapiteln sollte ein Medikament, das eine funktionelle Besserung des ischämischen akuten Nierenversagens erzielen könnte, folgende Eigenschaften erfüllen: Erstens sollte eine nachgewiesene protektive Wirkung im Bezug auf Tiermodelle des Ischämie-Reperfusionsschadens bestehen. Zweitens sollte das Medikament den NO-Stoffwechsel möglichst auf verschiedenen Ebenen wie über eine Regulation der Expression oder Phosphorylierung der NO-Synthasen oder über die Methylarginine beeinflussen können, da diese Regulationsstufen protektiv im ischämischen akuten Nierenversagen wirken.

1.5. Glitazone

Glitazone werden als orale Antidiabetika zur Therapie des Diabetes mellitus Typ 2 verwendet. Ihre Wirkung basiert auf einer Reduktion der Insulinresistenz im Fettgewebe. Zusätzlich vermindern Glitazone die freien Fettsäuren durch eine vermehrte zelluläre Aufnahme und vermehrte Synthese von Triglyceriden.

Außerdem bewirken sie eine verstärkte Differenzierung von Prä-Adipozyten. Sie steigern den Verbrauch von Glukose im Muskel durch eine Aktivierung der Gen-Expression des Glukose-Transporters 4 (GLUT-4). Zudem senken sie sowohl die hepatische Glukoneogenese als auch die Sekretion und Aktivität des Tumor-Nekrose-Faktor-alpha (TNF-alpha). Dieses Zytokin ist in den Prozess der gestörten Insulin-Aktivität in Muskelzellen involviert. Weitere Effekte betreffen die übrigen Komponenten des metabolischen Syndroms wie Hypertension, Inflammation oder endotheliale Dysfunktion (ED) (Iglesias2006). Auf molekularer Ebene sind Glitazone Agonisten des nuklären Rezeptors „peroxisome-proliferator activated γ “ (PPAR γ). Nach Bindung an diesem Rezeptor erfolgt dessen Aktivierung zu einem Transkriptionsfaktor, der zwei verschiedene Effekte auslösen kann (Abbildung 13): In der Transaktivierung, die DNA-abhängig ist, bildet PPAR γ ein Heterodimer mit dem Retinoid X Rezeptor. Dieses Heterodimer erkennt verschiedene Antwort-Elemente (PPAR-response elements=PPRE) in der Promotorregion der Zielgene. Diese Bindung wiederum führt zur Transkription der Zielgene. Durch Binden der Agonisten an den Rezeptor unterläuft dieser eine konformationale Umformung, die die Rekrutierung von Co-Faktoren und Co-Aktivatoren ermöglicht. Durch diese Interaktion können verschiedene PPRE auf dem DNA-Strang angesteuert werden. Neben der Transkription kann es ebenso zu einer Transrepression kommen. Hier blockiert die durch Liganden aktivierte PPAR γ bestimmte Signaltransduktionswege, was zu einer verminderten Transkription der Zielgene führt. Die Transrepression ist DNA-unabhängig. Beispiele hierfür sind der Nuklear- κ B (NF- κ B) Signalweg, das TRE-Antwortelement oder der STAT-Signalweg (Abbildung 13, Yki-Jaervinen2004).

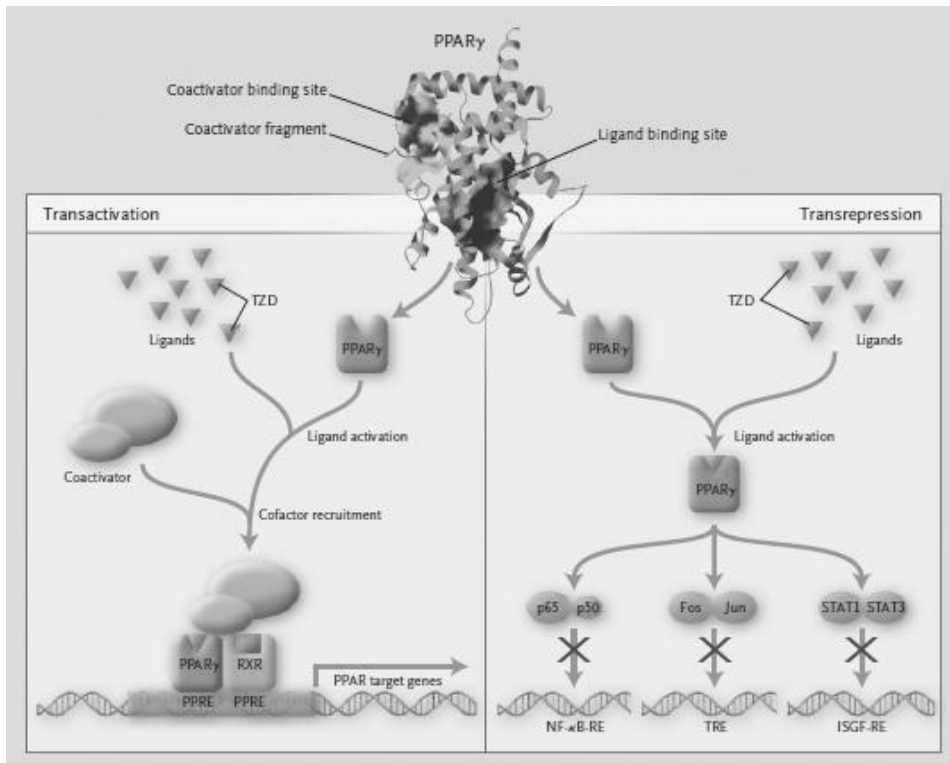


Abb. 13:
Molekularer
Wirkmechanismus
PPAR γ -Agonisten
aus
YkiJaervinen2004

Glitazone werden hauptsächlich hepatisch über Cytochrom P450 (CYP) 2C8 zu inaktiven Metaboliten abgebaut. Weniger als 1% des Medikaments wird im Urin in unveränderter Form ausgeschieden. Die Plasmakonzentration entwickelt sich im Zeitverlauf bei nierengesunden Patienten und bei Patienten mit leicht-, mittel- oder hochgradiger Nierenfunktionseinschränkung gleich. Diese Ergebnisse bestätigten sich auch beim Vergleich des Konzentrationsverlaufes zwischen gesunden und Hämodialysepatienten (Iglesias2006).

Aufgrund dieser Eigenschaften eignen sich Glitazone speziell zur Behandlung eines Diabetes Mellitus Typ 2 bei Patienten mit eingeschränkter Nierenfunktion. Die Glitazonderivate Rosiglitazon und Pioglitazon können den HbA1c um ca. 0,5%-1,5% senken. In Europa sind nur Kombinationstherapien mit Sulfonylharnstoffen zugelassen, wenn eine Unverträglichkeit oder Kontraindikation bezüglich Metformin besteht. (Iglesias2006).

Neben Ihrer antidiabetogenen Wirkung besitzen PPAR γ -Agonisten verschiedene pleiotrope Eigenschaften: Sie üben einen protektiven Effekt in der Kanzero- (Fujisawa2008a, Nakajima2008) und Organogenese (Wada2006), in

der Entstehung einer Schockreaktion (Abdelrahman2005), in der Parkinson-Erkrankung (Kumar2009), in der Inflammationsreaktion und im Ischämie/Reperfusionsschaden aus. Aufgrund des ubiquitären Vorkommens des PPAR γ -Rezeptors wirken diese Eigenschaften auf verschiedene Organsysteme. (Abdelrahman2005).

1.5. Arbeitshypothese

Die Applikation von Glitazonen führt im Tiermodell zu einer Verminderung des Ischämie/Reperfusionsschadens sowohl der Lunge (Okada2002), des Intestinums (Nakajima2001), des Magens (Wada2004), des Cerebrums (Kaundal2009) als auch des Myokards (Gonon2007). Der genaue Mechanismus ist hier nicht geklärt, man vermutet eine multifaktorielle Wirkungsweise (Sivarajah2003): Eine entscheidende Komponente ist hierbei der antiinflammatorische Effekt, der in jedem der Modelle zu finden ist. Diese äußert sich durch eine reduzierte Expression von Entzündungsmarkern wie iNOS oder von Markern einer Markophageninfiltration (Cuzzocrea2004a).

In Studien des Maus- und Rattenmodells der Myokardischämie konnten durch die Arbeitsgruppe um Ye neben dem antiinflammatorischen Effekt Einflüsse der Glitazone auf verschiedenen Ebenen des eNOS-Signalweges nachgewiesen werden: Diese umfassen neben einer Steigerung der Expression des Gesamt-eNOS (Ye2008) auch eine partielle Steigerung von eNOS phosphoryliert an Serine 1177 (Ye2008) oder Serine 633 (Ye2006). Schließlich konnte der protektive Effekt von Rosiglitazon im Modell der Myokardischämie in eNOS-Knockout Mäusen nicht mehr nachgewiesen werden (Gonon2007).

Ein Defekt der eNOS-vermittelten NO-Produktion spielt auch eine zentrale Rolle im ischämischen akuten Nierenschaden: eNOS-Knockout Mäuse zeigen einen deutlich größeren I/R-Schaden der Niere als entsprechende Wild-Typ Tiere (Schrier2004). Auf der anderen Seite ist eine verstärkte Gesamtexpression von eNOS (Schneider2003) oder eine verstärkte Expression von p-eNOS Ser1177 (Satake2008) mit einem geringeren I/R-Schaden assoziiert.

Aus der Tatsache, dass Glitazone einen protektiven Effekt im I/R-Schaden besitzen und dass PPAR γ -Rezeptoren auch in der Niere exprimiert werden (Iglesias2006b), ließ sich die erste Arbeitshypothese ableiten:

Die Gabe von Glitazonen bewirkt wie in anderen Organsystemen auch in der Niere eine Verminderung des akut induzierten Ischämie/Reperfusionsschadens.

Da die Besserung des I/R-Schadens im Myokard über eine Vermittlung des eNOS-Signalweges verläuft und dieser Signalweg im ischämischen Nierenversagen von zentraler Bedeutung ist, lautete die zweite Arbeitshypothese:

Der protektive Effekt von Glitazonen im Tiermodell des ischämischen akuten Nierenversagens beruht auf einer Beeinflussung des eNOS-Signalwegs.

Neben einer direkten Steigerung der NO-Produktion im NO-Signalweg durch verstärkte Phosphorylierung oder Gesamtexpression von eNOS, existieren auch Faktoren, die den eNOS-Signalweg indirekt beeinflussen: So supprimiert eine verstärkte Expression von iNOS die NO-Produktion durch eNOS (Schwartz1997). Das Methylarginin ADMA, ein Derivat des NOS-Substrates L-Arginin, wird als kompetitiver Inhibitor des eNOS-Signalweges beschrieben (Foerstermann2006). In der Literatur finden sich Hinweise, dass Glitazone sowohl die Expression von iNOS (Cuzzocrea2004a) als auch den Serumspiegel von ADMA (Stuehlinger2002, Wakino2005) senken. Folglich ist auch eine indirekte Beeinflussung denkbar. Dies führte zu einer Modifikation der zweiten Arbeitshypothese:

Der protektive Effekt von Glitazonen im Tiermodell des ischämischen akuten Nierenversagens beruht auf einer direkten und/oder indirekten Beeinflussung des eNOS-Signalwegs.

Diese Hypothesen sollten anhand des etablierten Ischämie/Reperusionsmodells des akuten Nierenversagens an der Ratte untersucht werden. Hierbei sollten funktionelle Daten anhand von Inulin und PAH Messungen aus Blut und Urin ermittelt werden. Die Analyse der Nierenhomogenisate bezüglich Proteinexpression und mRNA erfolgte mittels real-time PCR und Western-Blot. Die Serumanalysen von ADMA und SDMA wurden in einer Kooperation mittels der Gaschromatographie durchgeführt. Unter den verschiedenen synthetischen Glitazonen, die in den einzelnen Tiermodellen angewandt wurden, wurde für die vorliegende Arbeit Rosiglitazon ausgewählt. Rosiglitazon ist der potenteste und selektivste PPAR γ -Agonist (Iglesias2006b). Es besteht eine gute Korrelation zwischen der in vitro gemessenen Potenz und Selektivität der Glitazone und ihrem klinischen Effekt in vivo wie zum Beispiel die Fähigkeit zur Senkung des Blutzuckerspiegels. (Sivarajah2003). Folglich sollte auch im vorliegenden Versuchsaufbau Rosiglitazon den stärksten Effekt von allen Glitazonen besitzen.

2. Material und Methoden

2.1. Gewinnung der Proben

2.1.1. Versuchstiere

Versuchstiere waren weibliche Sprague Dawley Ratten der Firma Charles River Deutschland GmbH mit einem durchschnittlichen Gewicht zwischen 200-250g. Eine artgerechte Haltung entsprechend den Richtlinien des deutschen Tierschutzgesetzes war gewährleistet. Die Tiere waren einem Hell-Dunkel-Zyklus ausgesetzt, erhielten Standardfutter und freien Zugang zum Trinkwasser. Die Unterbringung im Tierstall erstreckte sich über mindestens 24 Stunden vor der Operation. Die Tötung erfolgte gemäß den Richtlinien für Tierversuche.

2.1.2. Versuchsgruppen

Es erfolgte eine Einteilung der Tiere in 5 Gruppen.

In der ersten Gruppe wurde durch Abklemmen der Nierenarterien ein akutes Nierenversagen hergestellt. Anschließend erfolgte die Gabe einer NaCl-Lösung in einer Verdünnung von 0,9%. Diese Gruppe wird im weiteren als „Clamp+NaCl“ Gruppe bezeichnet.

In der zweiten Gruppe wurde den Tieren nach dem Abklemmen anstatt der NaCl-Lösung das Medikament Rosiglitazon im gleichen Volumen appliziert. Diese Gruppe wird im weiteren als „Clamp+RGZ“ Gruppe bezeichnet.

Die dritte Gruppe, die „Sham-Gruppe“, wurde einer Operation mit NaCl-Gabe jedoch ohne Ligatur der Nierenarterien unterzogen.

Bei der vierten Gruppe, der Sham+RGZ Gruppe, erfolgten eine Operation ohne Abklemmung der Arterie und die Applikation von Rosiglitazon.

Anschließend wurden bei diesen vier Gruppen die später beschriebenen Entnahme- und Messoperationen durchgeführt.

Die „Kontroll“-Gruppe wurde nur dieser Entnahme- und Messoperation unterzogen.

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

2.1.3. Operation zur Induktion des akuten Nierenversagens

Mit Hilfe einer Wärmeplatte wurde eine konstante Körpertemperatur von 37°C gewährleistet. Zur Narkotisierung erhielten die Tiere Ketaminhydrochlorid (Ketavet[®], Pharmacia & Upjohn, Erlangen) in einer Dosierung von 100 mg/kg KG und Xylazinhydrochlorid 4% (Rompun[®], Bayer Vital, Aachen) in einer Dosierung von 10 mg/kg KG. Die Augen wurden mit Bepanthen Augen- und Nasensalbe (Hoffmann LA-Roche AG) vor Austrocknung geschützt.

Der Zugang erfolgte in Seitenlage über einen Paravertebralschnitt von ca. 2cm Länge, die Nieren wurden aus der Fettkapsel herauspräpariert und das versorgende Gefäßbündel dargestellt. Die A. renalis wurde von Vene und Ureter separiert und angeschlungen. Nachdem die Wunde mittels eines sterilen Pflasters (Tegaderm[®], 3M Health Care, Borken, Deutschland) abgedeckt wurde, konnte die andere Flanke gleichfalls eröffnet und präpariert werden.

Im Folgenden wurden die Aa. renales für eine Dauer von 45 Minuten abgeklemmt. Nach 15 Minuten Klemmzeit wurde der „Clamping+RGZ-Gruppe“ über eine Sonde Rosiglitazon in einer Dosierung von 0,2 mg/kg oral appliziert. Die Clamping-Gruppe erhielt statt dessen eine 0,9%ige NaCl-Lösung gleichen Volumens.

Nach Ablauf der 45 Minuten Klemmzeit wurden zügig die Klemmen gelöst, die Bulkfäden entfernt und die Wunde mittels Muskel- und Hautnaht verschlossen.

In der Aufwachphase bekamen die Tiere als Schmerzprophylaxe subcutan 2 mg/kg KG Tramadol (Tramal[®], Grünenthal GmbH, Aachen) gespritzt, außerdem 0,5 ml 0,9% NaCl, um den Flüssigkeitsverlust auszugleichen.

Die Operation der Sham-Gruppen erfolgte nach dem gleichen Schema ohne Abklemmung der a. renalis.

2.1.4. Mess- / Entnahmeoperation

Die zweite Operation diente der Gewinnung von Urin- und Serumproben sowie der Entnahme der Nieren. Sie wurde ca. 24 Stunden nach der Erstoperation durchgeführt.

Nach einer intraperitonealen Narkose wurde das Körpergewicht bestimmt.

Nachdem die Tier in Rückenlage auf der Wärmeplatte fixiert worden waren, wurde zuerst die A. und V. inguinalis freigelegt. Kleinere Gefäßäste wurden unterbunden. Anschließend erfolgte über einen heparinisierten Katheter (Liquimin® N 25000, Hofmann La Roche AG, Katheter: Polyethylen 1 mm Außen-, 0,5 mm Innendurchmesser) die Applikation von 1,3 ml eines in 0,9% NaCl gelösten Gemisches aus 0,24% Fluorescein Isothiocyanat Inulin und 0,2% Paraaminohippursäure (jeweils Firma Sigma-Aldrich, München, Deutschland) in die eröffnete V. inguinalis. Die ersten 0,3 ml der Infusion wurden hierbei als Bolus verabreicht. Über einen Perfusor, der auf eine Laufgeschwindigkeit von 1,2 ml / h eingestellt war, erfolgte die Gabe von 1 ml über einen Zeitraum von 50 Minuten.

Im zweiten Operationsschritt wurde ca. 20 Minuten nach der Bolusgabe die Harnblase freigelegt. Danach wurde sie eröffnet und ein Urinkatheter (Polyethylenschlauch, 1 mm Außendurchmesser) fixiert. Anhand einer am Katheter befestigten Messpipette war es möglich das Urinvolumen zu bestimmen. Die Messung des Volumens begann ca. 30 Minuten nach Bolusgabe und endete nach weiteren 20 Minuten gleichzeitig mit der PAH-Inulin-Infusion. Der Urin wurde zu weiteren Untersuchung bei -20° asserviert.

Im dritten Operationsschritt wurde der Bauchraum eröffnet und die Aorta abdominalis freipräpariert. Das durch Punktion gewonnene Blut wurde in heparinisierte Glasröhrchen abgefüllt. Anschließend wurden die Röhrchen bei 5°C und 4000 U/min für zehn Minuten zentrifugiert (Zentrifuge Heraeus, Megafuge 1.OR, Osterode). Der zellfreie Überstand wurde bei -20°C für weitere Messungen eingefroren.

Der letzte Operationsschritt stellte die zügige Entnahme der Nierenorgane dar. Die Organe wurden direkt in eine Krebslösung (119,35 mM NaCl, 0,04 % KCl, 0,03 % CaCl₂, 11,94 mM KH₂PO₄, 11,94 mM MgSO₄, 25,84 mM NaHCO₃)

gelagert, um Zellschäden zu vermeiden. Anschließen wurden sie in flüssigen Stickstoff gefroren und bei -80°C aufbewahrt.

2.2. Nierenfunktionsmessung

Die Nierenfunktion wurde 24 Stunden nach der Erstoperation mittels der Inulin und PAH Clearance bestimmt.

2.2.1. Inulin-Clearance

Inulin ist Polymer, das aus einer Kette von Fructosemolekülen besteht. Sein Molekulargewicht beträgt in etwa 5kD. Das Fruktan wird im Primärharn frei filtriert. Im folgenden Tubulussystem erfolgt weder eine Rückresorption noch eine Sekretion oder Metabolisierung. Außerdem wird durch Inulin die Nierenfunktionsleistung nicht eingeschränkt.

Die Inulin-Clearance ist das Volumen, das theoretisch in einer Zeiteinheit aus dem Plasma filtriert wird. Aufgrund der oben genannten Eigenschaften eignet sich Inulin als Indikatorsubstanz zur Bestimmung der glomeruläre Filtrationsrate. Die GFR lässt sich durch Messung der Inulin- und Urinwerte mit folgender Formel bestimmen:

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

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

Vor der Messung wurde ein Probenpuffer bestehend aus 1,15 g TES (N-tris[Hydroxymethyl]methyl-2-amino-ethanesulfonicacid) und 1,00 g MES (2-[N-Morpholino]ethanesulfonicacid) in 1 L Aqua dest. hergestellt. Mit Hilfe von Natronlauge wurde der Puffer auf ein pH von 7,4 eingestellt. Anschließend wurden die Urin- und Serumproben bei Zimmertemperatur aufgetaut, geschüttelt und im Verhältnis 1:500 mit Probenpuffer verdünnt.

Zur photometrischen Messung wurde in der PAH-Inulin-Infusion ein mit Fluoreszein-Isothiozyanat gekoppeltes Inulin (FITC-Inulin, Fa. Sigma) benutzt.

Ein Fluoreszenz-Photometer (1420 VICTOR² multilabel counter, Wallace, USA) regte die Proben mit einer Wellenlänge von 480 nm an. Die Emissionswellenlänge betrug 520 nm und ihre Intensität verhielt sich direkt proportional zur Inulinkonzentration der jeweiligen Proben.

Zur Kallibrierung der Messwerte wurde ein Inulinstandard eingesetzt.

2.2.2. PAH-Clearance

Die Paraaminohippursäure (PAH) ist ein organisches Anion. Sie dient als Testsubstanz für den renalen Plasmafluss (RPF). PAH wird im Primärharn filtriert und im Tubulussystem sezerniert. Deshalb kann bei einer gesunden Nierenfunktion die PAH-Clearance näherungsweise den renalen Plasmafluss darstellen.

$$RPF = (V_U \times U_{PAH}) / P_{PAH}$$

mit V_U = Urinvolumen pro Zeit, U_{PAH} = PAH-Konzentration in Urin und P_{PAH} = PAH-Konzentration im Plasma.

Die Ermittlung der PAH-Konzentrationen erfolgte photometrisch durch die modifizierte Anthron-Methode mit Azo-Kopplung.

Die Serum- und Urinproben wurden bei Zimmertemperatur aufgetaut und in einem Reagenzglasmixer geschüttelt. Anschließend erfolgte die Verdünnung mit einem Probenpuffer, der aus 0,33 M 70%-Perchlorsäure (HClO₄, Fa. Merck) hergestellt wurde. Durch Zentrifugieren und Entfernen des Überstandes konnte bei den Proben der Proteinanteil entfernt werden.

Danach wurden die Proben mit 1 mg / ml Natriumnitrit (Fa Merck) und 5 mg / ml Ammoniumamidosulfat (Merck) jeweils gelöst in Aqua dest. versetzt. Nach der Gabe von 32%-iger HCl zu jeder Probe erfolgte eine erneute Durchmischung. Anschließend wurde den Proben das Azo-Kopplungsreagenz N-(1-Naphtyl)äthylen-Diammoniumchlorid (Merck) in einer Konzentration von 5 mg/ml in Aqua dest. gelöst beigemischt.

Nach 10 Minuten wurde die Reaktion des Reagenz mit PAH zu einem violetten Farbkomplex durch Äthanol (Merck) gestoppt. Abschließend wurden die Proben

bei 120000 rpm zentrifugiert. Die Extinktion des Farbkomplexes wurde in einem Spektralphotometer (DPC, Biemann GmbH, Bad Nauheim) bei einer Wellenlänge von 550 nm erfasst. Hieraus konnte bei bekannten molaren Extinktionskoeffizienten und bekannter Schichtdicke die Konzentration von PAH errechnet werden.

2.3. Weitere Messungen

2.3.1. Aufarbeitung der Proben

Teile der bei -80°C gelagerten Proben wurden zur Aufarbeitung entnommen. Nach einer Zerkleinerung mittels eines Stahlmörser wurde die Proben mit Lysispulver (Tris-HCl [pH 7,0], 25mM; reduziertes Glutathion, 7mM; EDTA [pH 8,0] 0,5 mM; PMSF 0,2 mM; Leupeptin, $1\mu\text{M}$; Pepstatin A $1\mu\text{M}$; Trans-Epoxy succinyl-L-Leucylamido butane, $1\mu\text{M}$; Trypsininhibitor 1mg/l) versetzt und mit einem Ultra-Turrax-Homogenisierer T8 (Ika Labortechnik, Staufen, Deutschland) homogenisiert. Anschließend wurde der Proteingehalt der Proben mit Hilfe des Bradford-Assays bestimmt (Bradford-Reagenz: Coomassie – Blue G250, 0,01%; 96%-Ethanol, 4,7%; 85% Phosphorsäure, 8,5%). Die Proben wurden entsprechend dem Proteingehalt mit Probenpuffer (Tris-Puffer 200 mM, 6% SDS, 15% Glycerol, Bromthymolblau) versetzt und für 5 Minuten bei 95°C denaturiert. Anschließend wurden die Proben portioniert und bei -20°C tiefgefroren.

2.3.2. Western-Blot Analyse

Nach Auftauen und Zentrifugieren wurden Proteinlysate bei einem Proteingehalt von $30\mu\text{g}$ auf ein 5%iges Sammelgel (TrisHCl, pH6,8 500 μl ; Acylamid/Bisacrylamid 40%, 250 μl ; dd H₂O 1250 μl ; SDS 10% 18 μl ; APS 10% 7,5 μl ; TEMED 2,5 μl) aufgetragen.

Die Auftrennung erfolgte über ein 10%iges Trenngel (TrisHCl pH 8,8 1000 μl ; Acylamid/Bisacrylamid 40%, 1000 μl ; dd H₂O 2000 μl ; SDS 10% 45 μl ; APS 10% 15 μl ; TEMED 5 μl) bei 125 Volt und 80mA über zwei Stunden. Der verwendete

Laufpuffer bestand aus Tris Base 15,1g; Glycin 94g; SDS (10%) 50ml; auf 1000ml H₂O.

In einem mit Blottingpuffer (Tris Base 5,8g; Glycin 94g; SDS (10% aus 10ml) 0,38g; auf 1000ml H₂O) gefüllten Tankblot (Fa. Biorad) wurde das Protein vom Gel auf eine Nitrocellulose-Membran (Amersham Pharmacia Biotech, England) übertragen.

Um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren, wurde die Membran für eine Stunde bei Raumtemperatur mit Blotto-Lösung (3%igem fettfreies Milchpulver in Tris-Puffer-Lösung-TBS (Tris, 20mM; NaCl, 150mM; pH7,5) und 0,1% Tween (Tween 20 pure, Serva, Deutschland) versetzt.

Im nächsten Schritt wurden zu den Membran nach dreimaligen, je 5 minütigem Waschen mit Waschpuffer (TBS-Tween-Puffer: Trisbase 20mM, NaCl 137 mM, Tween 20 0,05%) die entsprechenden Antikörper (Tabelle 2) in den genannten Konzentrationen in der Blotto-Lösung gegeben und für eine Nacht bei 4°C inkubiert.

Tab. 2: verwendete Antikörper im Western-Blot

AK	Firma	Molekular Gewicht	Kon- zentration	2. AK	Kon- zentration
p-eNOS Ser1117	BD Transduction Laboratories	140 kDa	1 : 500	Rabbit-IgG, DAKO	1 : 2.000
p-eNOS Ser633	Upstate	140 kDa	1 : 250	Rabbit-IgG, DAKO	1 : 2.000
p-Akt Ser473	Cell Signaling	60 kDa	1 : 10.000	Rabbit-IgG, DAKO	1 : 2.000
DDAH-1	Santa Cruz Biotechnology	32 kDa	1 : 1.000	Goat-IgG, DAKO	1 : 5.000
DDAH-2	Abcam	36 kDa	1 : 1.000	Goat-IgG, DAKO	1 : 5.000
PRMT-1	Santa Cruz	42 kDa	1 : 500	Mouse-IgG, DAKO	1 : 10.000
ED-1	Serotec	110 kDa	1 : 500	Mouse-IgG, DAKO	1 : 10.000
CC3	Cell Signaling	17 kDa	1 : 250	Rabbit-IgG, DAKO	1 : 2.000
β-Aktin	Sigma	44 kDa	1 : 50.000	Mouse-IgG, DAKO	1 : 10.000

p-eNOS = phosphorylierte endotheliale NO-Synthase;

DDAH = Dimethylarginindiaminohydrolase ; PRMT = Proteinargininmethyltransferase;

CC3 = Cleaved caspase 3

Daraufhin erfolgte ein dreimaliges Waschen mit Waschpuffer. Der zweite Antikörper, der mit Horseradish-Peroxidase markiert gegen den ersten Antikörper gerichtet war, wurde in entsprechender Konzentration in der Blottolösung für 45 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

Nach dreimaligen Auswaschen des Zweit-Antikörpers wurden die Detektionsreagenzien I und II (ECL, Amersham Pharmacia Biotech, England) in

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

2.3.3. real-time PCR

Die schockgefrorenen Organe wurden einer RNA-Analyse mittels PCR unterzogen. Hierfür wurde die RNA mit Hilfe des „Qiagen RNA Isolation Kits“ (Qiagen, Hilden, Deutschland) extrahiert. Nachdem die RNA-Konzentration bestimmt worden war, wurde die cDNA mittels des „iScript cDNA synthesis kit“ (Biorad, CA, USA) entsprechend der mitgelieferten Anleitung bestimmt: Die real-time PCR wurde entsprechend dem „iQ SYBR-Green Supermix RT-PCR system protocol“ (Biorad, CA, USA) durchgeführt. Zuerst wurden die Proben bei 95°C für drei Minuten denaturiert, gefolgt von 46 Zyklen der Denaturierung, Annealing der Primer (63.8 °C eNOS; 59 °C iNOS), Elongation (72 °C, 30 s) und Fluorescence Analyse (83 °C eNOS; 78 °C iNOS) für 15s. Die Primer für iNOS waren 5'-GCAGGTTGAGGACTTCTTCCA-3' (sense) und 5'-GCCCTTTTTTGCTCCATAGGAAA-3' (antisense), was RT-PCR-Produkt bestehend aus in einem 94 bp (Basenpaare) resultierte. Die Primer für eNOS waren 5'-CACACTGCTAGAGGTGCTGGAA-3' (sense) und 5'-TGCTGAGCTGACAGAGTAGTAC-3' (antisense), was in einem RT-PCR-Produkt bestehend aus 109 bp resultierte. Für β -Aktin waren die Primer 5'-TCTACAATGAGCTGCGTGTG-3' (sense) und 5'-TACATGGCTGGGGTGTGAA-3' (antisense), was in einem RT-PCR Produkt bestehend aus 129 bp resultierte. Sämtliche PCR-Produkte wurden mittels einer Agarose-Gel Elektrophorese und einer Schmelzpunkt-Analyse auf ihre korrekte Größe getestet. Die quantitative Bestimmung wurde über die $\Delta\Delta C_T$ -Methode durchgeführt, die β -Aktin als Referenz verwendet. Die Expression in den Kontrollproben wurde gleich 1 gesetzt.

2.3.4 Serum-Messungen

Die Messung der Serum-Werte von Arginin, ADMA (Asymmetric Dimethylarginin) und SDMA (Symmetric Dimethylarginin) für sämtliche Tiere erfolgte im Labor von Professor Dr. Böger, Direktor des Instituts für klinische Pharmakologie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf, mit der Flüssigchromatographie-Methode mit nachgeschalteter Massenspektrometrie (LC-MS/MS).

2.4. Auswertungsverfahren und Statistische Methoden

Die deskriptive Darstellung dieser Arbeit erfolgt als Mittelwert mit +/- Standardfehler (SEM). Zur Fragestellung der statistischen Signifikanz der Unterschiede zwischen den Kontrollgruppen und den behandelten Gruppen wurde der t-Test für ungepaarte Stichproben verwendet.

Signifikante Unterschiede im Vergleich zweier voneinander unabhängiger Stichproben wurden mit dem t-Test ermittelt. Signifikante Unterschiede wurden bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit (p =probability) von unter 5% festgestellt.

3. Ergebnisse

3.1. Gewichtsverteilung

Das mittlere Gewicht der Versuchstiere betrug zu Versuchsbeginn 210,5 g +/- 3,3 g (MW +/- SEM). Zwischen den einzelnen Gruppen fanden sich zu Versuchsbeginn keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der Gewichtsverteilung (ANOVA).

3.2. Postoperative Messung funktioneller Parameter

Zur Bestimmung der GFR wurde die Clearance von Inulin, zur Abschätzung des renalen Plasmaflusses wurde die Clearance von PAH nach den in Material und Methoden angegebenen Formeln gemessen (Schneider2003).

3.2.1. Inulin – Clearance / PAH - Clearance

Die Messung der Inulin-Clearance zeigte bei den Kontrolltieren einen Wert von 0,94 +/- 0,12 ml/min, die Messung der PAH-Clearance ergab einen Wert von 6,1 +/- 1,2 ml/min. Diese Werte stimmen mit dem in dieser Arbeitsgruppe etablierten Normbereich einer intakten Nierenfunktion überein (Fenske2005, Fischer2008, Freund2005, Schneider2003, Schneider2007, Raff2005). Sowohl die Sham+NaCl Gruppe mit 0,84 +/- 0,23 ml/min für Inulin und mit 7,2 +/- 2,0 ml/min für PAH als auch die Sham+RGZ Gruppe mit 0,69 +/- 0,08 ml/min für Inulin und mit 7,25 +/- 0,8 ml/min für PAH lagen ebenfalls in diesem Bereich. Deutlich reduziert im Vergleich zu den Kontrollgruppen und zu den Sham-Gruppen war die Clearance von Inulin und PAH bei den Gruppen mit induziertem Nierenversagen. Das Ausmaß dieses Abfalls steht für die Clamp+NaCl Gruppe im Einklang mit publizierten Studien der Arbeitsgruppe (Schneider2003, Schneider2007). Innerhalb der Clamping-Gruppen bestand jeweils ein signifikanter Unterschied zwischen der Clamp+NaCl Gruppe mit 0,038 +/- 0,015 ml/min für Inulin und 0,19 +/- 0,06 ml/min für PAH und der Clamp+RGZ Gruppe mit 0,1 +/- 0,03 ml/min für Inulin und 0,81 +/- 0,25 ml/min

für PAH (Abbildung 14+15). Insofern besserte sich unter der Gabe von Rosiglitazon die Inulin-Clearance um den Faktor 2,6, die PAH-Clearance um den Faktor 4,3. Im Vergleich zu den Sham-Gruppen bestand immer noch eine deutliche Reduktion um die Faktoren 8,4 (Sham+NaCl) und 6,9 (Sham+RGZ) für die Inulin-Clearance und um die Faktoren 8,8 (Sham+NaCl) und 8,9 (Sham+RGZ) für die PAH-Clearance.

Sivarajah et al. verwenden in ihrer Arbeit ein ähnliches Tiermodell und bestimmen die Creatinin-Clearance mit und ohne die Gabe von Rosiglitazon (Sivarajah2003). Diese zeigt im ischämischen Nierenversagen eine ähnliche Regulation wie die Inulin-Clearance.

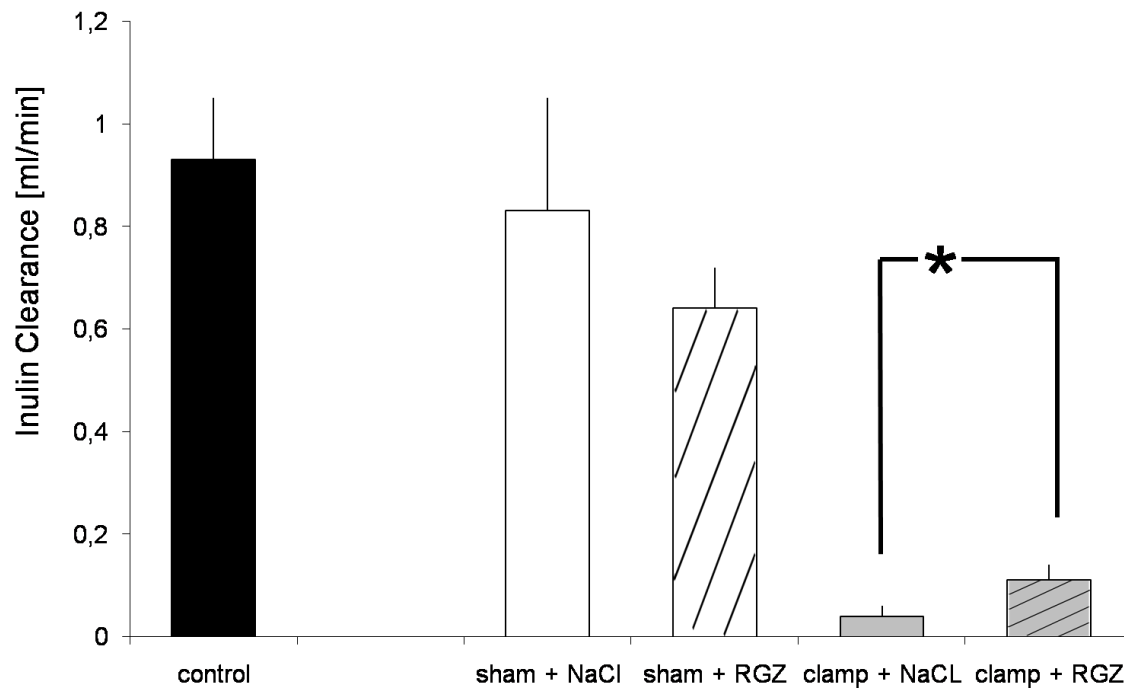


Abb. 14: Inulin-Clearance der Gruppen Kontrolle, Sham+NaCl, Sham+Rosiglitazon, Clamp+NaCl und Clamp+Rosiglitazon 24 Stunden nach der Erstoperation, mit n=6.

* = $p < 0,05$

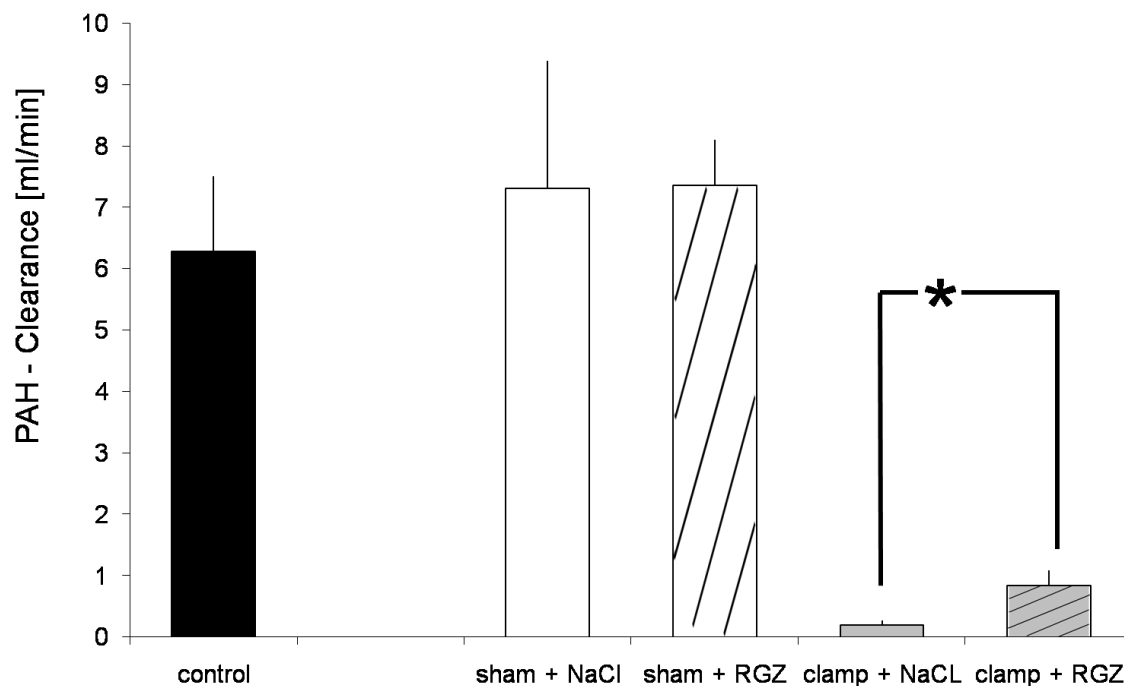


Abb. 15: PAH-Clearance der Gruppen Kontrolle, Sham+NaCl, Sham+Rosiglitazon, Clamp+NaCl und Clamp+Rosiglitazon 24 Stunden nach der Erstoperation, mit n=6.

* = $p < 0,05$

Zusammenfassend bessert die Gabe von Rosiglitazon sowohl die Inulin- als auch die PAH-Clearance im akuten Nierenversagn. Auffällig hierbei ist, dass sich die Inulin-Clearance durch Rosiglitazon etwas mehr als verdoppelt, während die PAH-Clearance sich mehr als vervierfacht.

In der Literatur finden sich zwei mögliche Pathomechanismen, die die PAH-Clearance beeinflussen (Schneider2003): Zum einen führt ein reduzierter Plasmafluss zu einem verminderten Angebot an PAH. Zum anderen ist eine verminderte Sekretionsleistung der proximalen Tubuluszellen möglich, die bei Corrigan et al. im akuten ischämischen Nierenversagen bereits beschrieben ist (Corrigan1999). Um die Sekretionsleistung der proximalen Tubuluszellen zu bestimmen, wurde mit der im Methodik-Teil angegebenen Formel die PAH-Nettosekretion errechnet.

3.2.2. PAH-Nettosekretion

Die Kontroll-Tiere hatten eine PAH-Nettosekretion von 200 $\mu\text{g}/\text{min}$ +/- 30 $\mu\text{g}/\text{min}$. Im Vergleich zu den beiden Sham-Gruppen zeigte sich kein

Unterschied. In der Clamp+NaCl Gruppe fiel die Sekretion auf 26,9 µg/min +/- 3,8 µg/min. Die Gabe von Rosiglitazon in der Clamp-Gruppe besserte die PAH-Nettosekretion um den Faktor 3,1 auf 82,7 µg/min +/- 7,7 µg/min (Abb. 16). Der Abfall der Nettosekretion in der Clamp+NaCl Gruppe entspricht in seiner Höhe (Faktoren 7,8 (Sham+NaCl)) den Ergebnissen vorangegangener Arbeiten (Corrigan1999, Schneider2003). Der Abfall in der Clamp+RGZ ist mit dem Faktor 2,5 (Sham+NaCl und Sham+RGZ) deutlich geringer. Dieser deutliche Unterschied zwischen beiden Clamp Gruppen wurde bisher in der Literatur noch nicht beschrieben.

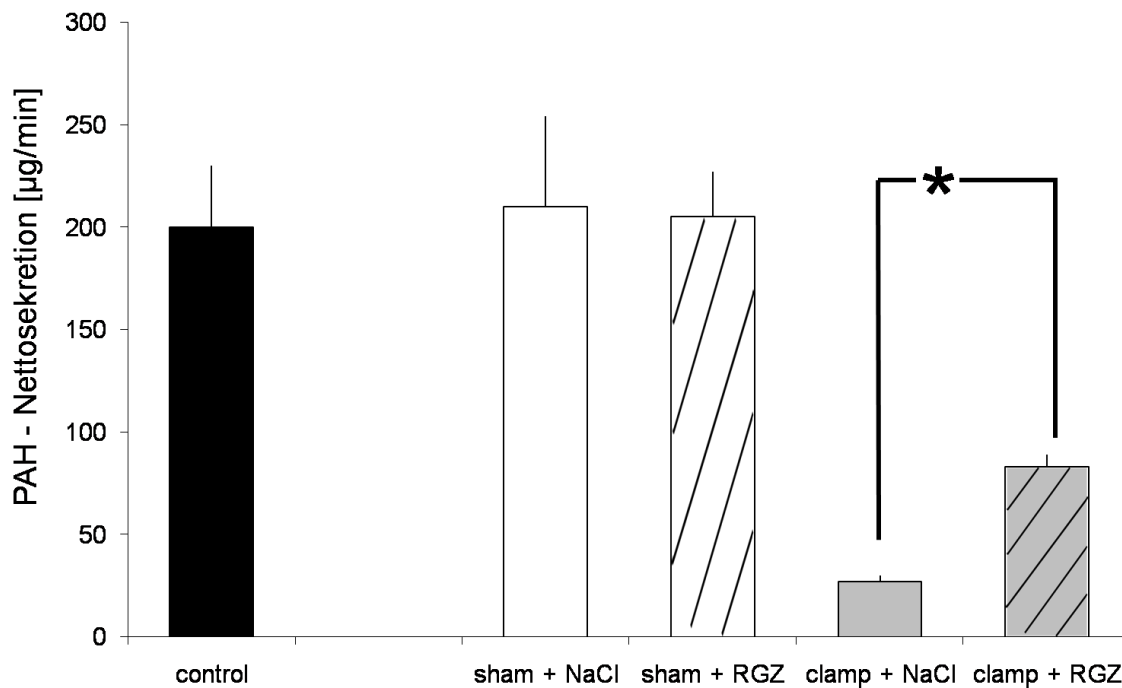


Abb. 16: PAH-Nettosekretion der Gruppen Kontrolle, Sham+NaCl, Sham+Rosiglitazon, Clamp+NaCl und Clamp+Rosiglitazon 24 Stunden nach der Erstoperation, mit n=6.

* = p<0,05

Durch die Gabe von Rosiglitazon bessert sich die Sekretionsleistung der Tubuluszellen. Das Ausmass der Besserung entspricht mit dem Faktor 3,1 ungefähr der Inulin-Clearance mit 2,6. Da sich die PAH-Clearance um den Faktor 4,3 bessert, scheint neben der Sekretionsleistung auch die renale Durchblutung zuzunehmen.

Diese wird maßgeblich - wie in der Einleitung dargelegt - durch das Molekül NO reguliert. Die Mehrproduktion von NO durch die endotheliale NO-Synthase (eNOS) besitzt einen protektiven glomerulären Effekt sowohl im Bezug auf die Zellfunktion als auch auf die Durchblutung (Schrier2004, Goligorsky2002).

3.3. Beteiligung des eNOS-Signalweges

Eine Aktivitätssteigerung von eNOS mit einer Mehrproduktion von NO kann über eine Phosphorylierung des Enzyms an Serine Position 1177 bewirkt werden. Eine vermehrte Expression von p-eNOS Ser1177 wirkt im ischämisch induzierten Nierenschaden protektiv (Satake2008).

Rosiglitazon verursacht in vitro eine verstärkte Aktivierung der eNOS über die Phosphorylierung an Ser1177 (Polikandriotis2005). Aus diesem Grund wurde die Expression von p-eNOS Ser1177 im Nierenhomogenisat mittels Western-Blot Analyse untersucht.

3.3.1. Phosphoryliertes eNOS Ser1177

Die Western-Blot Analyse der aktivierten eNOS ergab, dass alle Gruppen eine signifikante Erhöhung der Expression von p-eNOS Ser1177 zur Kontrollgruppe aufwiesen. Die Sham+NaCl und die Sham+RGZ Gruppe sind mit 173 % +/- 10 % und 162 % +/- 5 % signifikant erhöht. Auch der Vergleich der Kontrollgruppe zur Clamp+NaCl Gruppe mit 190 % +/- 10 % und zur Clamp+RGZ Gruppe mit 180 % +/- 13 % ergab signifikante Expressionsanstiege. Es lagen keine signifikanten Unterschiede vor zwischen den Gruppen Sham+NaCl und Clamp+NaCl bzw. zwischen Sham+RGZ und Clamp+RGZ (Abbildung 17).

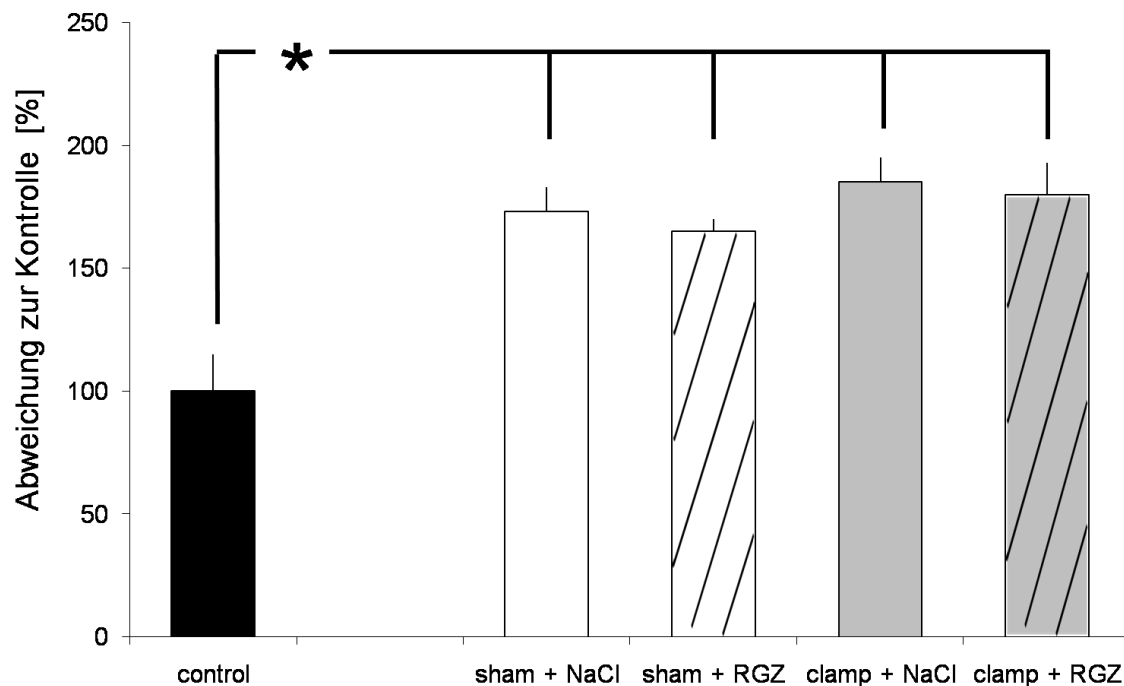


Abb. 17: Expression der phosphorylierten eNOS Ser1177 / β -actin der Gruppen Kontrolle, Sham+NaCl, Sham+Rosiglitazon, Clamp+NaCl und Clamp+Rosiglitazon, 24 Stunden nach der Erstoperation, n=6.

*=p<0,05 zur Kontrollgruppe

Ein Einfluss von Rosiglitazon auf die Phosphorylierung der eNOS an Ser1177 ist nicht nachweisbar. Die Sham und Clamp-Gruppen hatten alle ein ähnliches Expressionsniveau, wobei der signifikante Anstieg um jeweils fast 100 % zur Kontrollgruppe auffällig war. Dieses Phänomen wird in dieser Arbeit erstmals beschrieben. Im Vergleich zur Kontrollgruppe waren die übrigen Tiere einem operativen Eingriff ausgesetzt. Deshalb scheint es möglich, dass ein perioperativer Stress eine Expressionssteigerung von p-eNOS Ser1177 bewirkt.

Neben einer Phosphorylierung von eNOS an Ser1177 ist in vivo eine vermehrte Phosphorylierung an Ser633 durch den PPAR γ -Liganden Pioglitazon bekannt (Ye2008). Eine Phosphorylierung von eNOS Ser633 führt zu einer gesteigerten Enzymaktivität.

3.3.2. Phosphoryliertes eNOS Ser633

Es zeigte sich im Vergleich zur Kontrollgruppe eine signifikante Erhöhung der Expression von p-eNOS Ser633 um über 100 % in den Gruppen Sham+NaCl (219 % +/- 17 %), Sham+RGZ (225 % +/- 19 %) und Clamp+NaCl (228 % +/- 19 %). Innerhalb dieser drei Gruppen war das Expressionslevel nahezu identisch, es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede. Die Clamp+RGZ Gruppe hingegen erreichte mit 106 % +/- 17 % ein ähnliches Niveau wie die Kontrollgruppe. Somit ergab sich ein signifikanter Abfall der Clamp+RGZ Gruppe sowohl zur Clamp+NaCl Gruppe um den Faktor 2,2 als auch zu beiden Sham-Gruppen (Abbildung 18).

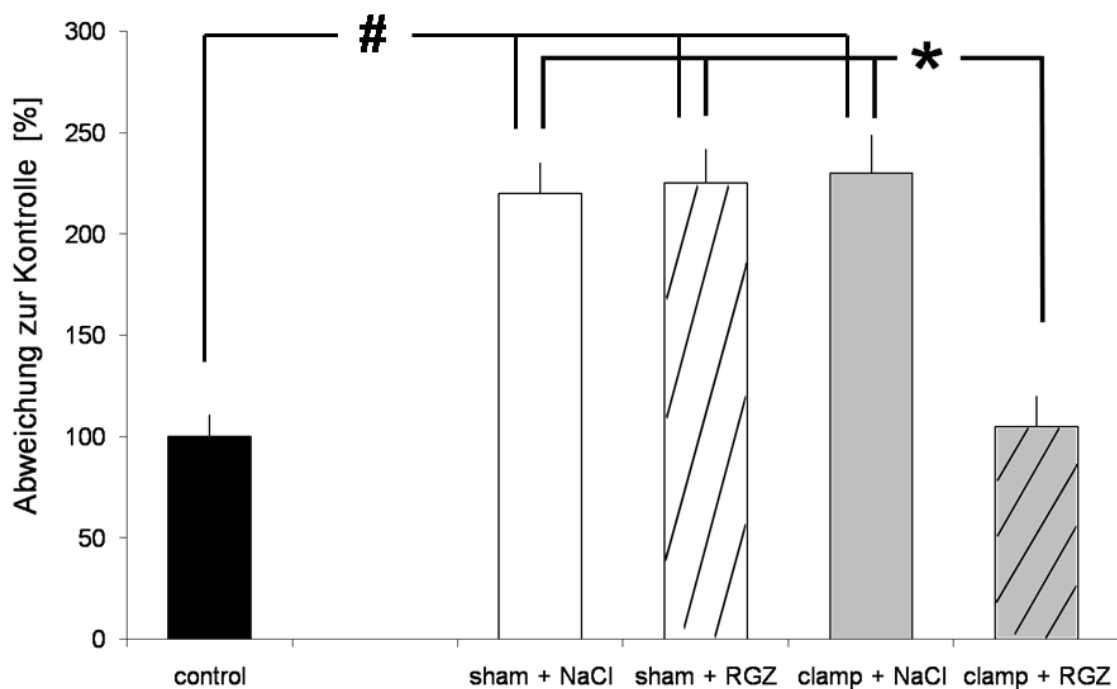


Abb. 18: Expression der phosphorylierten eNOS Ser633 / β -actin der Gruppen Kontrolle, Sham+NaCl, Sham+Rosiglitazon, Clamp+NaCl und Clamp+Rosiglitazon 24 Stunden nach der Erstoperation, mit n=6

*=p<0,05 zu Clamp + RGZ; #=p<0,05 zur Kontrollgruppe

Dieses Ergebnis spricht nicht für eine vermehrte Produktion von NO durch eNOS im akuten ischämischen Nierenversagen durch Rosiglitazon, sondern für eine verminderte Produktion. In der Literatur findet sich kein Erklärungsansatz für diese Herabregulation der p-eNOS Ser633 durch Rosiglitazon. Auffällig ist

außerdem der Expressionsanstieg der beiden Sham-Gruppen und der Clamp + NaCl Gruppe zur Kontrollgruppe. Auch hier bietet sich analog zur Regulation von p-eNOS Ser1177 der operative Stress als mögliche Erklärung an.

In der Literatur werden noch weitere aktivitätssteigernde Phosphorylierungen z.B. an Ser 114, Ser 617 beziehungsweise Dephosphorylierungen an Thr495 beschrieben (Michell2002). In vielen dieser (De)Phosphorylierungen ist im Rahmen einer Signalkaskade die Phosphorylierung des Proteins Akt vorgeschaltet (Boo2002, Harris2004).

Folglich kann die Phosphorylierung von Akt ein Hinweis auf eine vermehrte NO Produktion über eine Regulation der (De)Phosphorylierung von eNOS sein. Aus diesem Grund wurde der Phosphorylierungsstatus des Signalproteins Akt untersucht.

3.3.3. Akt-Phosphorylierung an Ser473

Die Untersuchung der Expression dieses phosphorylierten Proteins ergab zwischen der Kontrollgruppe und den Sham Gruppen keinen signifikanten Anstieg. Ein signifikanter Unterschied bestand zwischen der Sham+NaCl Gruppe mit 147,5 % +/- 25 % und der Sham+RGZ Gruppe mit 105 % +/- 10 %. Die Clamp+NaCl Gruppe zeigte im Vergleich zur Sham+NaCl eine signifikante Erhöhung der Expression um den Faktor 1,86 auf 275 % +/- 60 % im Verhältnis zur Kontrolle. Analog war der Anstieg von Sham+NaCl auf Sham+RGZ um den Faktor 2,14 auf 225 % +/- 60 % im Verhältnis zur Kontrolle ebenfalls signifikant. Zwischen Clamp+NaCl und Clamp+RGZ zeigte sich keine signifikante Differenz (Abbildung 19).

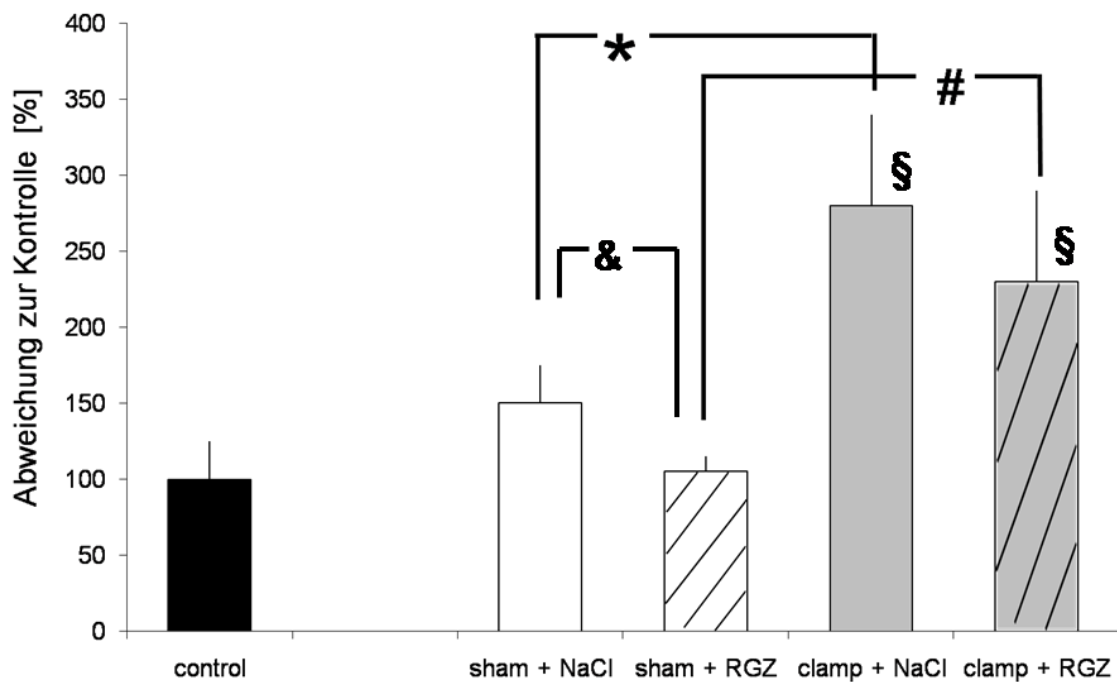


Abb. 19: Expression von phosphoryliertem Akt Ser473 / β -actin der Gruppen Kontrolle, Sham+NaCl, Sham+Rosiglitazon, Clamp+NaCl und Clamp+Rosiglitazon 24 Stunden nach der Erstoperation, mit n=6.

*=p<0,05; #=p<0,05; & = p<0,05; § = p<0,05 zur Kontrollgruppe

Der Unterschied zwischen Sham+NaCl und Sham+RGZ war zwar signifikant aber gering. Außerdem waren beide Sham-Gruppen gegenüber der Kontrollgruppe nicht signifikant verändert, was zusätzlich gegen einen substantiellen Effekt dieses Unterschiedes spricht. Die Induktion eines ischämischen Nierenversagens bewirkte ungefähr eine Verdopplung Expressionssteigerung von p-Akt in den Gruppen mit NaCl (86 %) und in den Gruppen mit Rosiglitazon (114 %).

Auch in anderen Arbeiten zeigt sich ein Expressionsanstieg von p-Akt im Tiermodell des ischämischen akuten Nierenversagens je nach Ischämie und Reperusionszeit zwischen 30 % (Park2004), 100 % (Li2008) und 250 % (Xie2006).

Somit ist die Phosphorylierung von Akt unabhängig von der Applikation von Rosiglitazon jedoch abhängig von der Induktion des Nierenversagens.

Zusammenfassend kann man folgern, dass die Verbesserung der renalen Funktion durch Rosiglitazon nicht durch eine verstärkte Phosphorylierungsreaktionen von Akt bzw. eNOS bewirkt wird.

Eine vermehrte NO-Produktion durch eNOS kann im akuten ischämischen Nierenversagen auch direkt auf eine Expressionssteigerung der eNOS zurückgeführt werden (Chen2008, Liu2007, Yamashita2003, Yamasowa2005, Dobrian2004).

In der Literatur finden sich verschiedene in vivo Studien, in denen durch die Gabe von Rosiglitazon die Expression von eNOS gesteigert wird (Gonon2007, Huang2008, Ye2008). Aus diesem Grund wurde die Expression der eNOS mRNA mittels PCR bestimmt.

3.3.4. Expression der eNOS-mRNA

Zwischen der Kontrollgruppe mit 100 % +/- 18,3 % und den Sham-Gruppen mit 102 % +/- 16,5 % (Sham+NaCl) bzw. 83,3 % +/- 9,7 % (Sham+RGZ) bestand kein signifikanter Unterschied bezüglich des Expressionslevels relativ zu β -actin. Im Vergleich zu den Gruppen Kontrolle und Sham+NaCl war das Expressionsniveau der Clamp-Gruppen mit 22,9 % +/- 4,9 % (Clamp+NaCl) und 57 % +/- 12,5 % (Clamp+RGZ) jeweils signifikant erniedrigt. Die Expression von eNOS-mRNA war in der Gruppe Clamp+RGZ im Vergleich zur Gruppe Clamp+NaCl signifikant um den Faktor 2,46 höher. Das Ausmaß des Expressionsanstieges von eNOS-mRNA durch die Gabe von Rosiglitazon im akuten Nierenversagen wurde zusätzlich dadurch verdeutlicht, dass sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen Sham+RGZ und Clamp+RGZ zeigte. Das Expressionsniveau zwischen den Gruppen Sham+NaCl und Clamp+NaCl dagegen wurde signifikant um den Faktor 4,36 herabreguliert, der Faktor zwischen Sham+NaCl und Clamp+RGZ betrug nur 1,8 (Abbildung 20).

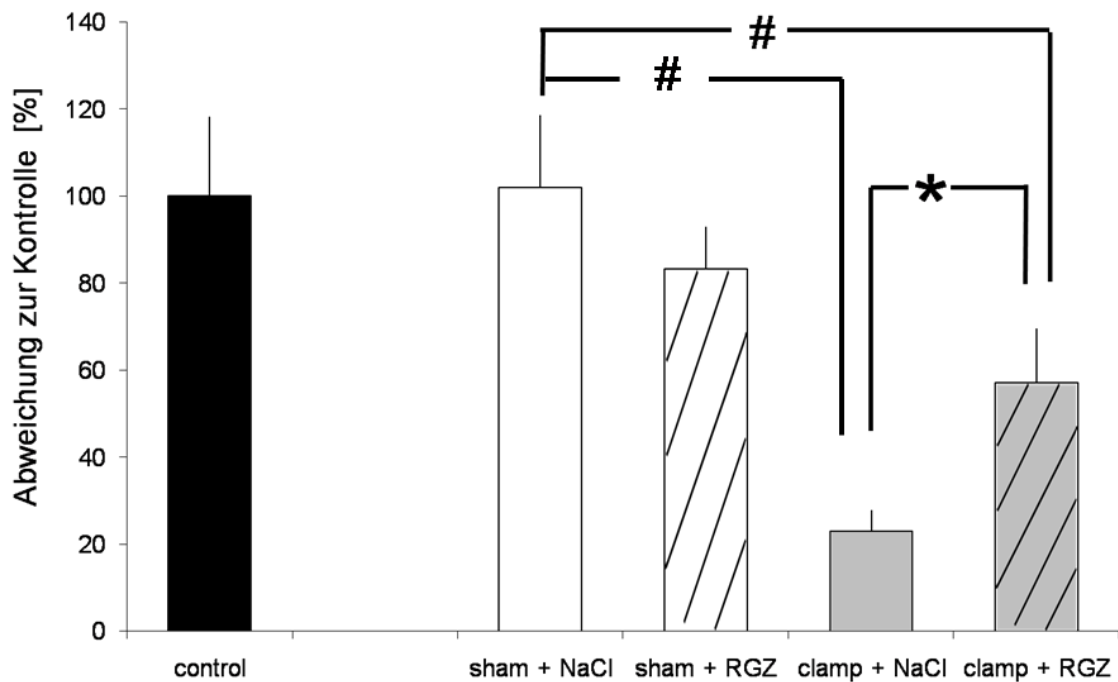


Abb. 20: Expression der eNOS-mRNA / β -actin der Gruppen Kontrolle (n=8), Sham+NaCl (n=8), Sham+Rosiglitazon (n=8), Clamp+NaCl (n=7) und Clamp+Rosiglitazon (n=7) 24 Stunden nach der Erstoperation,

*=p<0,05; #=p<0,05

Die Ergebnisse zeigen, dass Rosiglitazon den Expressionsabfall von eNOS im akuten ischämischen Nierenversagen deutlich reduziert.

Chen et al. (Chen2008) zeigen in einem Rattenmodell des renalen Ischämie/Reperfusionsschadens, dass eine Änderung der eNOS-Expression auf mRNA-Ebene zu nahezu identischen Veränderungen auf Protein-Ebene führt. Zudem bestätigen zahlreiche Studien, dass eine Besserung der eNOS-Expression im Tiermodell des renalen Ischämie/Reperfusionsschadens mit einer Besserung der renaler Funktionsparameter assoziiert ist (Liu2007, Yamashita2003, Foglieni2006, Chen2008).

Deshalb weist die Regulation der mRNA-Expression in der vorliegenden Arbeit auf eine gleiche Regulation der Proteinexpression und somit auf eine vermehrte Produktion des protektiven NO hin.

Allerdings kontrastiert der deutlich geringere Abfall der eNOS-Expression mit der moderaten Besserung der renalen Funktionsparameter im Nierenversagen: Während sich die Inulin-Clearance und PAH-Clearance von den Sham-Gruppen

auf die Clamp+RGZ Gruppe um fast 90 % verringert, beträgt der Unterschied zwischen Sham-Gruppen und der Gruppe Clamp+RGZ bezüglich der Expression von eNOS-mRNA maximal 40 %.

Eine mögliche Erklärung für diese Diskrepanz ist der geringere Phosphorylierungsstatus von eNOS Ser633: Durch die Gabe von Rosiglitazon steigt die Expression von eNOS-mRNA um den Faktor 2,5 während die Expression von p-eNOS Ser633 um den Faktor 2,2 fällt. Allerdings bewirkt die Phosphorylierung an eNOS Ser633 nur eine schwache Aktivitätssteigerung im Vergleich zu dem nicht-phosphorylierten eNOS (Michell2002).

Durch die Regulation der eNOS-mRNA lässt sich die Besserung der Inulin- und PAH-Clearance erklären, da eNOS, wie in der Einleitung dargelegt, vor allem die glomerulär/vaskuläre Komponente im akuten Nierenversagen beeinflusst. Die im Vergleich zu unbehandelten Tieren deutlich erhöhte PAH-Nettosekretion im akuten Nierenversagen weist auf einen zusätzlichen tubulären Effekt durch die Applikation von Rosiglitazon hin.

Hiervon ausgehend war aus zwei Gründe sinnvoll, im nächsten Schritt den iNOS-Signalweg zu untersuchen:

1. Bezüglich der tubulären Komponente übt die induzierbare NO-Synthase (iNOS), deren Expression im ischämischen Nierenversagen deutlich gesteigert ist (Chen2008, Liu2007), einen inflammatorisch zytotoxischen Effekt auf die Tubuluszellen aus (Golikorsky2002).
2. Zudem wird - wie in der Einleitung dargelegt - ein inhibitorischer Effekt der iNOS auf eNOS postuliert (Heemskerk2009): Zum einen indirekt über einen Verbrauch von Tetrahydrobiopterin (BH₄), das einen essentiellen Cofaktor der eNOS darstellt. Zum anderen direkt über die inhibitorische Wirkung von NO.

In vitro und in vivo Studien am Inflammationsmodell verschiedener Organe weisen auf eine Reduktion der iNOS Expression durch Rosiglitazon hin (Cuzzocrea2004a, Cuzzocrea2004, Folch-Puy2006, Paola2006, Shiojiri2002). Die Beteiligung der iNOS Expression im akuten Nierenversagen unter Gabe von Rosiglitazon wurde mittels realtime-PCR untersucht.

3.4. Die Beteiligung des iNOS-Signalweges

3.4.1. Expression der iNOS-mRNA

Eine Analyse der mRNA Regulation der induzierbaren NO Synthase zeigte keine signifikanten Unterschiede im Expressionsniveau zwischen den Gruppen Kontrolle (100 % +/- 33 %), Sham+NaCl (101 % +/- 21 %) sowie Sham+RGZ (68 % +/- 14 %). Die Expression von iNOS-mRNA in der Gruppe Clamp+NaCl war mit 392 % +/- 79 % gegenüber der Gruppe Sham+NaCl um den Faktor 3,9 und gegenüber der Gruppe Sham+RGZ um den Faktor 5,8 erhöht. Die Gabe von Rosiglitazon im akuten Nierenversagen führt zu einem um den Faktor 2,3 geringeren Expressionsanstieg (170 % +/- 21,5 %) im Vergleich zur Clamp+NaCl Gruppe. Durch diesen reduzierten Anstieg besteht kein signifikanter Unterschied zwischen der Kontrollgruppe und der Gruppe Clamp+RGZ. Allerdings besteht weiterhin ein signifikanter Unterschied zwischen der Clamp+RGZ-Gruppe und den Sham-Gruppen um die Faktoren 1,7 (Sham+NaCl) bzw. 2,5 (Sham+RGZ) (Abbildung 21).

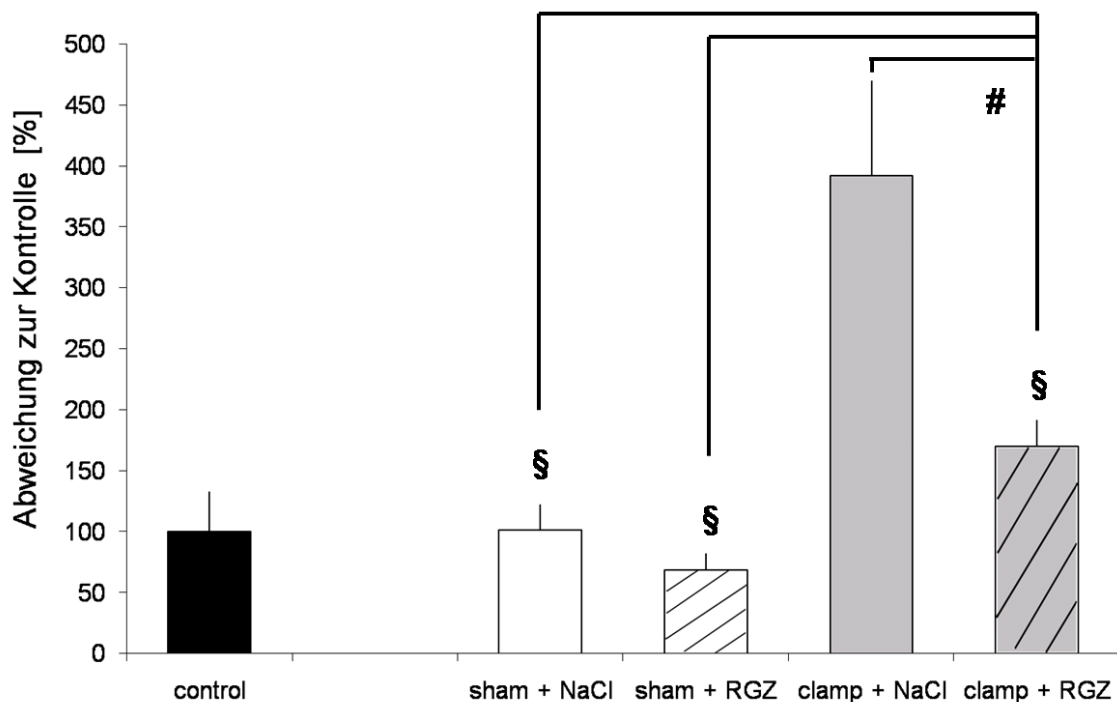


Abb. 21: Expression der iNOS-mRNA / β -actin der Gruppen Kontrolle (n=8), Sham+NaCl (n=8), Sham+Rosiglitazon (n=8), Clamp+NaCl (n=7) und Clamp+Rosiglitazon (n=7) 24 Stunden nach der Erstoperation,

§=p<0,05 zu Clamp+NaCl; #=p<0,05 zu Clamp+RGZ

Der Anstieg der iNOS-mRNA Expression wird im akuten Nierenversagen durch Rosiglitazon deutlich abgeschwächt. Hierdurch wird wahrscheinlich der zytotoxische Effekt des von iNOS produzierten NO auf die Tubuluszellen verringert. Deshalb kann die Besserung der tubulären Komponente durch Rosiglitazon gut durch die Regulation von iNOS erklärt werden.

Auffällig ist außerdem, dass der Faktor der Abschwächung zwischen den Gruppen Clamp+NaCl und Clamp+RGZ mit 2,3 fast genau dem Anstieg der eNOS-mRNA Expression zwischen diesen beiden Gruppen entspricht (Faktor 2,4).

In der Literatur finden sich Hinweise in vitro (Wessells2006) und in vivo in Wildtyp-Ratten (Vaziri1999), dass eine vermehrte NO-Produktion die Expression der eNOS-mRNA in Endothelzellen senkt. Folglich könnte die Abnahme der iNOS-mRNA mit verminderter NO-Produktion die Zunahme der eNOS-mRNA bedingen.

Ein weiterer Erklärungsansatz für einen Zusammenhang zwischen den Regulationen der beiden Enzyme stellt die Inflammationsreaktion dar:

Das Enzym iNOS ist im akuten Nierenversagen Mitauslöser und Marker der Inflammationsreaktion (Mark2005). In vielen Tiermodellen der Inflammationsreaktion und Gewebsschädigung zeigt sich neben einer gesteigerten iNOS Expression eine reduzierte eNOS Expression (Zhou1997, Chen1997). Hierbei ist ein inhibitorischer Einfluss von inflammatorischen Zytokinen auf die eNOS-Expression nachgewiesen (Valerio2006).

In vivo Studien am Inflammationsmodell zeigen, dass die durch Gabe von Rosiglitazon neben der Senkung der Expression von iNOS auch eine Abschwächung der Inflammationsreaktion (Chatterjee2002, Rodriguez-Reynoso2004a) und eine geringere Gewebsschädigung bewirkt wird. (Volti2007, Abaraviciene2008, Liu2004). Im Tiermodell des akuten ischämischen Nierenversagens wird durch Rosiglitazon die Inflammationsreaktion abgeschwächt (Sivarajah2003).

Um zu überprüfen, ob der postulierte inflammatorische und gewebstoxische Effekt von iNOS durch Rosiglitazon beeinflusst wird und ob die Inflammation die

inhibitorische Wirkung von iNOS auf eNOS vermitteln könnte, wurden im nächsten Schritt ein Marker der Inflammation und der Gewebsschädigung bestimmt.

Als etablierte Methode zur Bestimmung der Inflammationsreaktion wurde das Zelloberflächenprotein ED-1 als Marker der Infiltration von Monozyten und Makrophagen bestimmt (Raff2005, Villanueva2006, Villanueva2007).

3.4.2. Expression von ED-1

In der Kontrollgruppe wurden 16,3 +/- 2,2 ED-1 positive Zellen gezählt, in der Sham+NaCl Gruppe 17,5 +/- 3,5 und in der Sham+RGZ Gruppe 24,3 +/- 1,7. Innerhalb der Sham-Gruppen bestand kein Unterschied, jedoch zwischen der Kontroll-Gruppe und Sham+RGZ. Die Clamp-Gruppe war mit 34,3 +/- 2,4 Zellen gegenüber allen anderen Gruppen signifikant erhöht. Die Clamp+RGZ Gruppe war mit 17,6 +/- 0,7 Zellen nur gegenüber der Clamp+NaCl Gruppe signifikant reduziert (Abbildung 22).

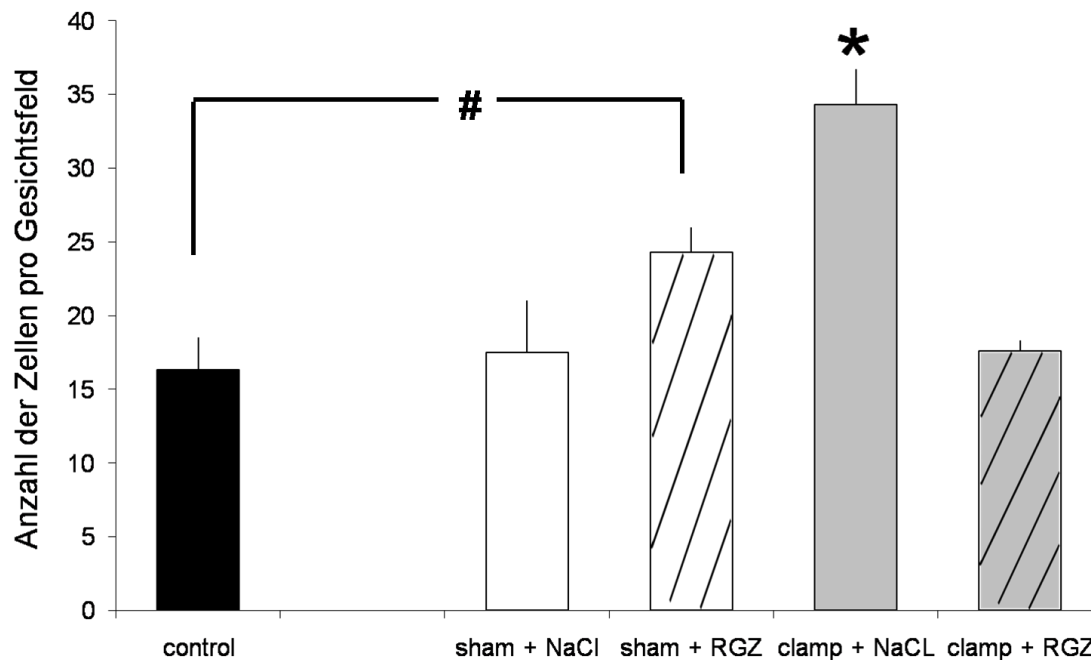


Abb. 22: Anzahl der ED-1 positiven Zellen pro μm^2 der Gruppen Kontrolle, Sham+NaCl, Sham+Rosiglitazon, Clamp+NaCl und Clamp+Rosiglitazon 24 Stunden nach der Erstoperation, mit n=6.

* = $p < 0,05$; # = $p < 0,05$ zur Kontrollgruppe

Im akuten ischämischen Nierenversagen hemmt die Gabe von Rosiglitazon die Infiltration durch Monozyten/Macrophagen komplett.

Für den signifikanten Anstieg um knapp 30% zwischen der Kontrollgruppe und der Gruppe Sham+RGZ findet sich keine adäquate Erklärung. Allerdings besteht kein signifikanter Unterschied zu der Gruppe Sham+NaCl. Folglich ist der Anstieg zwar signifikant jedoch wahrscheinlich nicht relevant.

Zur Bestimmung des gewebsschädigenden Effekts wurde die Apoptoserate der Zellen bestimmt. Die Messung der Cleaved Caspase 3 (CC3) ist als Indikator für das Ausmaß der Apoptose etabliert (Raff2005).

Rosiglitazon senkt in verschiedenen Tiermodellen die Expression von CC3 mit entsprechender Besserung der Gewebefunktion (Choi2007, Doi2007, Liu2004, Abaraviciene2008).

3.4.3. Expression der Cleaved Caspase 3 (CC3)

Die Expression der Cleaved caspase 3 zeigte keinen signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen Kontrolle mit 100 % +/- 24 % und Sham+NaCl mit 98 % +/- 21 %. Zu beiden Gruppen war das Expressionslevel der Gruppe Sham+RGZ (199 % +/- 42 %) um ungefähr das doppelte und das Expressionslevel der Gruppe Clamp+NaCl (307 % +/- 54 %) um ungefähr das dreifache signifikant erhöht. Zwischen den Gruppen Sham+RGZ und Clamp+NaCl zeigte sich kein signifikanter Unterschied. Die Gruppe Clamp+RGZ zeigte mit 109 % +/- 17 % ein ähnliches Expressionsniveau wie die Gruppen Kontrolle und Sham+NaCl und war zu den Gruppen Sham+RGZ und Clamp+NaCl signifikant erniedrigt.

(Abb. 23+24).

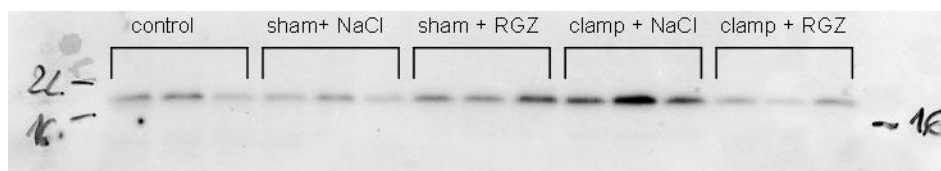


Abb. 23: Exemplarischer Western-Blot der CC3-Expression der Gruppen Kontrolle, Sham+NaCl, Sham+Rosiglitazon, Clamp+NaCl und Clamp+Rosiglitazon (jeweils 3 Tiere) 24 Stunden nach der Erstoperation. Zahlenskala in Kilodalton (kD).

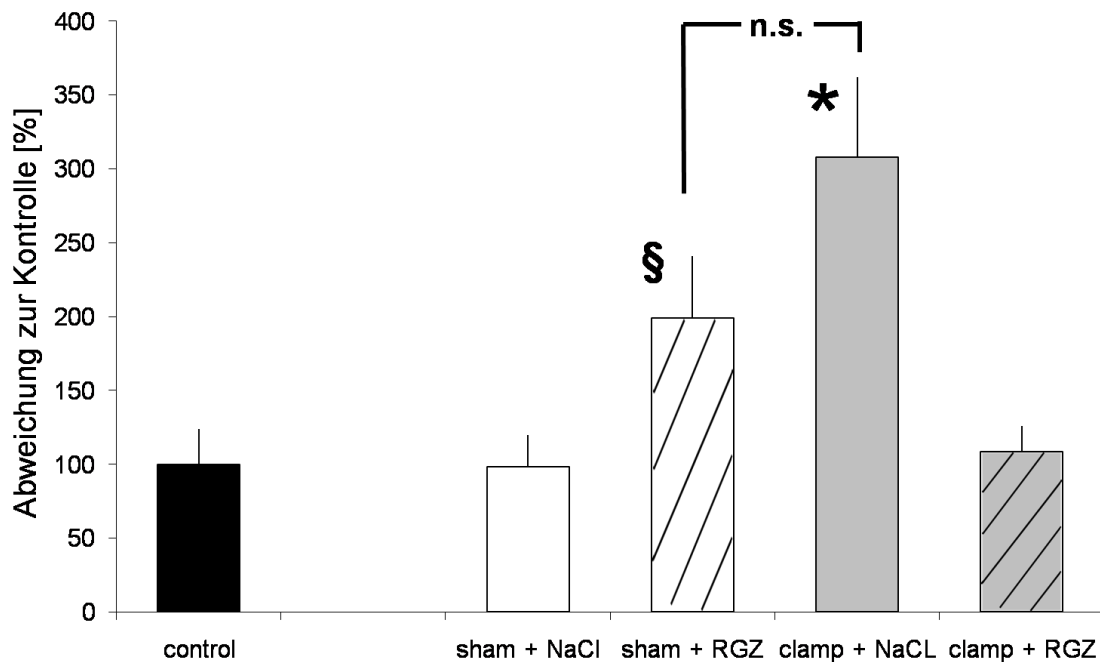


Abb. 24: Expression von Cleaved-Caspase 3 der Gruppen Kontrolle, Sham+NaCl, Sham+Rosiglitazon, Clamp+NaCl und Clamp+Rosiglitazon 24 Stunden nach der Erstoperation, n=9.

* = $p < 0,05$; § = $p < 0,05$; n.s. = nicht signifikant

Die Expression von CC3 steigt in unbehandelten Tieren im akuten Nierenversagen deutlich an. Die Gabe von Rosiglitazon im akuten Nierenversagen hemmt diesen Anstieg komplett.

Analog zu ED-1 zeigt sich ein signifikanter Anstieg der Expression von CC3 in der Gruppe Sham+NaCl, für den sich aktuell keine adäquate Erklärung findet. Die leichte Entzündungsreaktion durch Gabe von Rosiglitazon in Sham-Tieren hat kein Korrelat in der Expression von iNOS und in den funktionellen Parametern, bei denen sich jeweils kein signifikanter Unterschied zwischen den Kontrollgruppen und den Shamtieren zeigt. Dies deutet darauf hin, dass der Anstieg im vorliegenden Fall wahrscheinlich nicht relevant ist.

Insgesamt bestätigen die Ergebnisse zu CC3 und ED-1 die anhand der Regulation der iNOS-mRNA aufgestellte Vermutung, dass Rosiglitazon im akuten Nierenversagen die Inflammationsreaktion und den Gewebsuntergang deutlich mindert. Dadurch wird validiert, dass die Regulation der mRNA sich

auch auf der Proteinebene widerspiegelt und zu einer verminderten Produktion von zytotoxischen und proinflammatorischen NO führt.

Bezüglich der Regulation der eNOS-mRNA stehen durch diese Ergebnisse nun drei Erklärungsmöglichkeiten zur Verfügung:

- 1. Ein transkriptioneller Einfluss von Rosiglitazon auf eNOS.*
- 2. Ein direkter Einfluss von iNOS über den inhibitorischen Einfluss von NO.*
- 3. Ein indirekter Einfluss von iNOS über die Inflammationsreaktion.*

Eine Bewertung dieser Möglichkeiten folgt in der Diskussion.

Ungeklärt bleibt die Frage, warum durch die Gabe von Rosiglitazon im akuten Nierenversagen trotzdem nur ca. 12 % (Faktor 8) an Clearance-Leistung im Vergleich zu den Shamgruppen erreicht wird. Durch die Gabe von Rosiglitazon im akuten Nierenversagen steigt das Expressionsniveau der eNOS-mRNA von 25 % (Faktor 4) auf fast 60 % (Faktor 1,8) des Levels der Shamtiere. Der Anstieg der Expression iNOS-mRNA reduziert sich von einer Vervierfachung auf nur noch das 2fache im Vergleich zu den Shamtieren.

Anscheinend existieren Faktoren, die eine stärkere Besserung der renalen Funktion verhindern, indem sie entweder die NO-Produktion von eNOS trotz erhöhter Expression abmildern oder die NO-Produktion von iNOS trotz erniedrigter Expression verstärken. Letzteres scheint eher unwahrscheinlich, da mit dem Abfall der Marker ED-1 und CC3 eine effektive verminderte NO-Produktion von iNOS vorzuliegen scheint. Außerdem scheint der protektive Effekt von eNOS weitaus wichtiger für die renale Funktion zu sein als der cytotoxische Effekt von iNOS (Schrier2004).

Bezüglich eNOS bietet die verminderte Phosphorylierung an Ser633 im akuten Nierenversagen unter der Gabe von Rosiglitazon - wie bereits dargestellt - keine hinreichende Erklärung für die Diskrepanz zwischen der Regulation der Expression und funktionalem Effekt.

Außerdem liegt durch die Gabe von Rosiglitazon neben einer Steigerung der Expression von eNOS wahrscheinlich zusätzlich auch eine höhere Gesamtaktivität des Enzyms vor: iNOS und die Inflammationsreaktion üben

einen stark hemmenden Einfluss auf die Aktivität von eNOS aus (Heemskerk2009). Durch deren Reduktion sollte sich die NO-Produktion von eNOS unabhängig von der Expression erhöhen.

Aus diesen Gründen schien es sinnvoll, die Regulation von Faktoren zu untersuchen, die einen inhibitorischen Effekt auf die NO-Produktion von eNOS ausüben können. Wie in der Einleitung dargelegt, stellt das Asymmetrische-Dimethyl-Arginin (ADMA) einen solchen Faktor dar.

3.5. ADMA / DDAH 1 + 2 / PRMT 1 - Metabolismus

ADMA entsteht durch der Proteolyse aus Arginin-Resten, die durch das Enzym PRMT (Protein-Arginin-Methyl-Transferase) methyliert wurden. Abgebaut wird ADMA durch die Dimethylarginin-Diamino-Hydrolase (DDAH), zudem wird ADMA renal ausgeschieden. Die ADMA-Serumkonzentration ist bei renaler Funktionseinschränkung erhöht (Matsumoto2007, Volti2008). ADMA wirkt als kompetitiver Inhibitor zu L-Arginin am eNOS-Enzym: Es übt seine inhibitorische Wirkung nicht über eine Regulation der Expression sondern über eine Einschränkung der Aktivität des eNOS-Enzyms aus.

PPAR γ -Agonisten senken ADMA, indem sie die Expression von DDAH erhöhen und somit den Abbau von ADMA verstärken (Stuehlinger2002, Wakino2005).

3.5.1. Der ADMA - Serumspiegel

Der Serumspiegel von ADMA zeigte sich im ANV gering, aber signifikant erhöht. Die Steigerung betrug ca. 19% in der Clamp+NaCl-Gruppe (1,08 μ M +/- 0,06 μ M) und ca. 22% in der Clamp+RGZ-Gruppe (1,15 μ M +/- 0,03 μ M) jeweils zu der korrespondierenden Sham-Gruppe. Zwischen beiden Clamp Gruppen bestand kein Unterschied, ebenso zeigten sich zwischen der Kontrollgruppe (0,95 μ M +/- 0,06 μ M) und den Sham-Tieren (0,9 μ M +/- 0,02 für Sham+NaCl bzw. 0,89 μ M +/- 0,03 μ M für Sham+RGZ) keine Signifikanz (Abbildung 25).

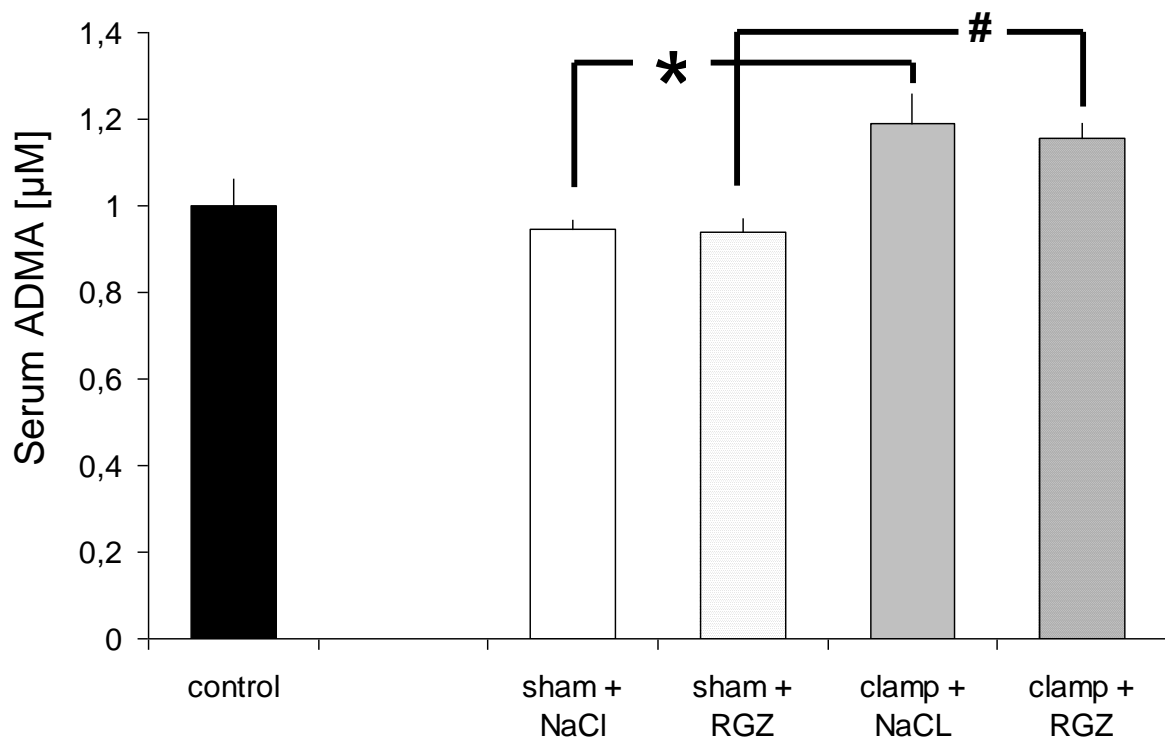


Abb. 25: Serumspiegel von ADMA in μM der Gruppen Kontrolle, Sham+NaCl, Sham+Rosiglitazon, Clamp+NaCl und Clamp+Rosiglitazon 24 Stunden nach der Erstoperation, mit $n=10$.

*= $p<0,05$; #= $p<0,05$

Der ADMA-Serumspiegel ist im akuten Nierenversagen signifikant erhöht. Rosiglitazon übt keinen direkten Einfluss auf den ADMA-Serumspiegel aus.

Hieraus ergaben sich zwei Fragestellungen:

1. *Welches sind die Ursachen des ADMA-Serumanstieges im akuten Nierenversagen?*
2. *Welche Wirkung hat dieser Anstieg auf den NO-Stoffwechsel?*

Zu 1.: Welches sind die Ursachen des ADMA-Serumanstieges im akuten Nierenversagen?

Neben der renalen Ausscheidung bestimmen das ADMA-produzierende Enzym PRMT und zu einem großen Ausmaß die ADMA-abbauenden Enzyme DDAH 1 / 2 den Serumspiegel von ADMA. Das Enzym PRMT besitzt 10 Isoformen. Die Messung der Isoform 1 als Indikator für die Produktion von ADMA ist etabliert, da es sich um ein Schlüsselenzym handelt und seine

Konzentration deutlich höher ist als die der anderen Isoformen (Matsuguma2006, Osanai2003). Deshalb wurde PRMT 1 neben DDAH 1 und 2 mittels Western-Blot Analyse im Nierengewebshomogenisat bestimmt. In der Literatur finden sich Hinweise, dass PPAR γ -Agonisten die DDAH 2 Expression steigern (Wakino2005). In einer in vitro Studie senkt ein PPAR γ -Agonist die PRMT 1-Expression (Osanai2003).

3.5.2. Expression von PRMT 1

Der Vergleich zwischen Kontrolle (100 % +/- 8 %), Sham+NaCl (92 % +/- 5 %) und Clamp+NaCl (106 % +/- 9 %) zeigte ein fast identisches Niveau der Expression von PRMT 1. Auch zwischen den Gruppen Sham+RGZ (57 % +/- 14 %) und Clamp+RGZ (68 % +/- 4 %) zeigte sich kein relevanter Unterschied. Die Gabe von Rosiglitazon war mit einer signifikanten Herabregulation um 43% von der Sham+NaCl auf die Sham+RGZ Gruppe beziehungsweise um 33% von der Clamp+NaCl auf die Clamp+RGZ Gruppe assoziiert (Abbildung 26).

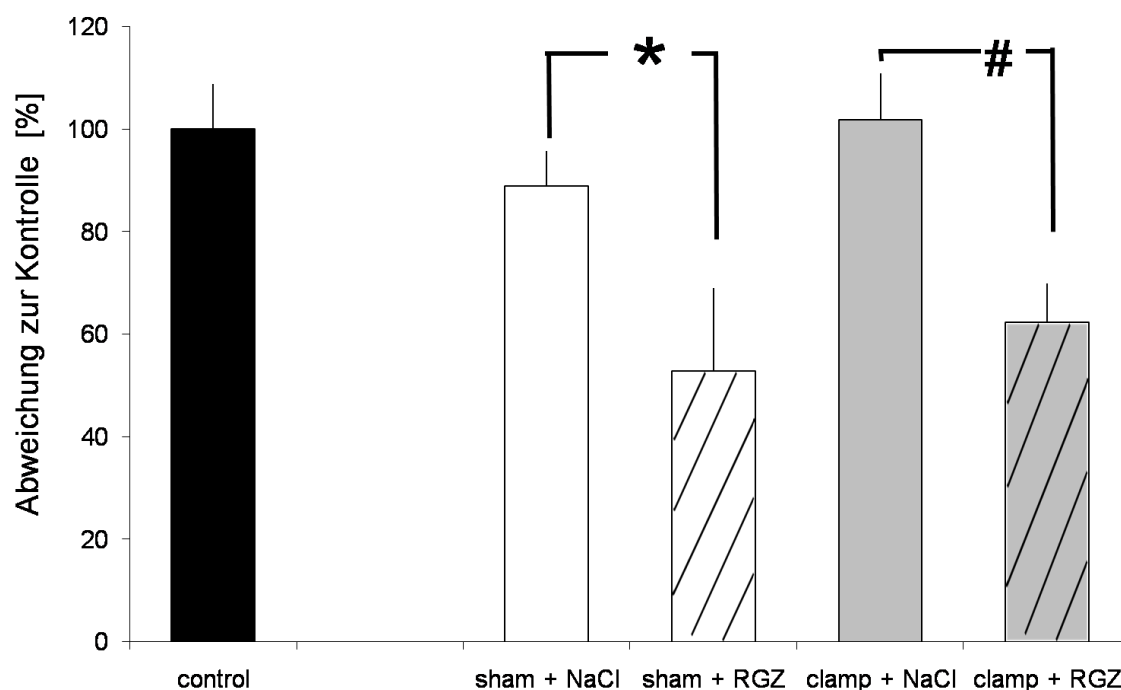


Abb. 26: Expression PRMT 1 der Gruppen Kontrolle (n=6), Sham+NaCl (n=8), Sham+Rosiglitazon (n=9), Clamp+NaCl (n=9) und Clamp+Rosiglitazon (n=7) 24 Stunden nach der Erstoperation, Kontrollgruppe als Referenzgruppe mit 100%.

*=p<0,05; #=p<0,05

Die Expression von PRMT 1 ist abhängig von der Gabe von Rosiglitazon jedoch unabhängig von der Induktion eines ischämischen akuten Nierenversagens. Folglich stellt die Expression von PRMT 1 keine Erklärung für den Serumanstieg von ADMA im akuten Nierenversagen dar.

3.5.3. Expression von DDAH 2

Die Western-Blot Analyse der Expression von DDAH 2 ergab keine signifikanten Unterschiede zwischen der Kontrollgruppe (100 % +/- 15 %), den Shamgruppen (0,73 % +/- 16 % für Sham+NaCl bzw. 125 % +/- 20 % für Sham+RGZ) und den Clampgruppen (102 % +/- 19 % für Clamp+NaCl bzw. 119 % +/- 19 % für Clamp+RGZ) (Abbildung 27).

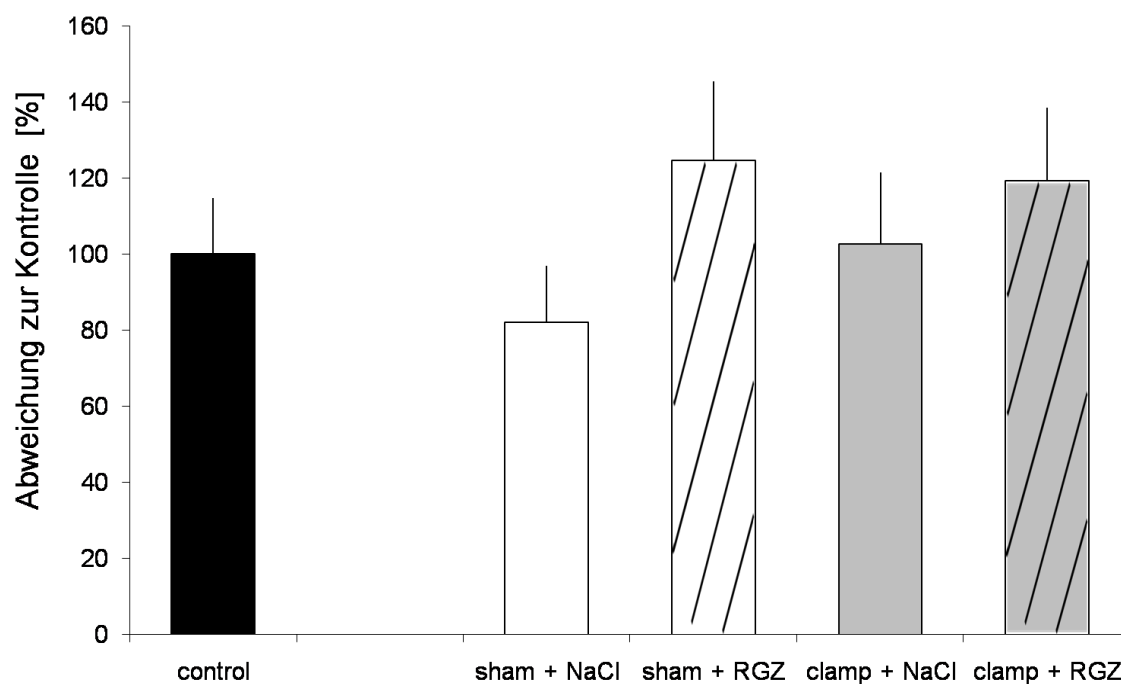


Abb. 27: Expression DDAH 2 der Gruppen Kontrolle, Sham+NaCl, Sham+Rosiglitazon, Clamp+NaCl und Clamp+Rosiglitazon 24 Stunden nach der Erstoperation, Kontrollgruppe als Referenzgruppe mit 100%, n=9.

DDAH 2 wird weder durch die Gabe von Rosiglitazon beeinflusst noch bewirkt es im akuten Nierenversagen den Anstieg von Serum-ADMA.

3.5.4. Expression von DDAH 1

Die Expression des Isoenzym DDAH 1 wurde in den Gruppen Clamp+NaCl (71 % +/- 7 %) und Clamp+RGZ (70 % +/- 11 %) im Vergleich zu den Gruppen Sham+NaCl (94 % +/- 6 %) bzw. Sham+RGZ (104 % +/- 14 %) um jeweils ca. 30% signifikant herabreguliert. Die Sham-Tiere weisen keinen Unterschied zu den Kontrollen (100 % +/- 6 %) auf (Abbildung 28).

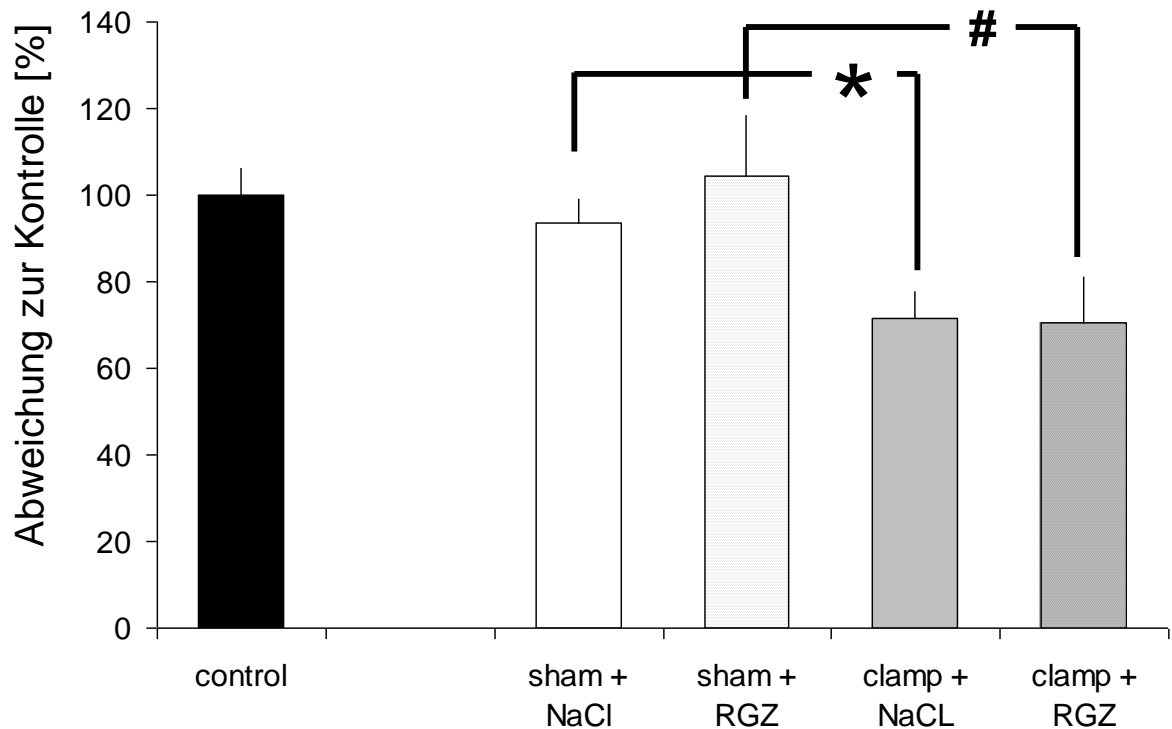


Abb. 28: Expression DDAH 1 der Gruppen Kontrolle, Sham+NaCl, Sham+Rosiglitazon, Clamp+NaCl und Clamp+Rosiglitazon, 24 Stunden nach der Erstoperation, Kontrollgruppe als Referenzgruppe mit 100%, n=9.

*=p<0,05; #=p<0,05

DDAH 1 wird durch die Applikation von Rosiglitazon nicht beeinflusst. Der Abfall der Expression von DDAH 1 (ca. 30 %) im akuten Nierenversagen korrelierte in seiner Höhe mit dem Anstieg des ADMA-Serumspiegels (ca. 20 %).

Insofern könnte die Regulation von DDAH 1 den Anstieg des ADMA-Serumspiegels im akuten Nierenversagen erklären.

Zu 2.: Welche Wirkung hat dieser Anstieg auf den NO-Stoffwechsel?

Um die Frage nach dem Einfluss von ADMA auf den NO-Stoffwechsel beantworten zu können, ist eine isolierte Bewertung des ADMA-Serumspiegels nicht hinreichend.

Die Aminosäure L-Arginin dient als Substrat der NO-Synthasen. Der Mangel an Substrat stellt somit einen weiteren Faktor dar, der die NO-Produktion durch eNOS mindern kann. Der kompetitive Inhibitor ADMA verhindert eine Bindung von L-Arginin an dem Enzym eNOS und erhöht dessen Michaelis-Menten Konstante (K_m). Das bedeutet, dass bei erhöhter ADMA-Konzentration eine erhöhte L-Arginin-Konzentration nötig ist, um die gleiche Bindungseffektivität zu erreichen (Bode-Boeger2007). ADMA senkt folglich die Aktivität des eNOS-Enzyms. Das Ausmass dieser Wirkung ist von der Konzentration des L-Arginins abhängig.

Um also den inhibitorischen Effekt von ADMA abschätzen zu können, war als nächster Schritt die Bestimmung des Serumspiegels von L-Arginin notwendig.

3.6. L-Arginin und der L-Arginin / ADMA-Quotient

3.6.1. Der L-Arginin - Serumspiegel

Der Serumspiegel von L-Arginin zeigte sich im ANV signifikant erhöht. Die Steigerung betrug ca. 61 % in der Clamp+NaCl-Gruppe (186 μM +/- 11 μM) und ca. 67 % in der Clamp+RGZ-Gruppe (173 μM +/- 12 μM) jeweils zu der korrespondierenden Sham-Gruppe. Zwischen beiden Clamp Gruppen bestand kein Unterschied, ebenso zeigten sich zwischen der Kontrollgruppe (93 μM +/- 19 μM) und den Sham-Tieren (111 μM +/- 11 für Sham+NaCl bzw. 108 μM +/- 28 μM für Sham+RGZ) keine Signifikanz (Abbildung 29).

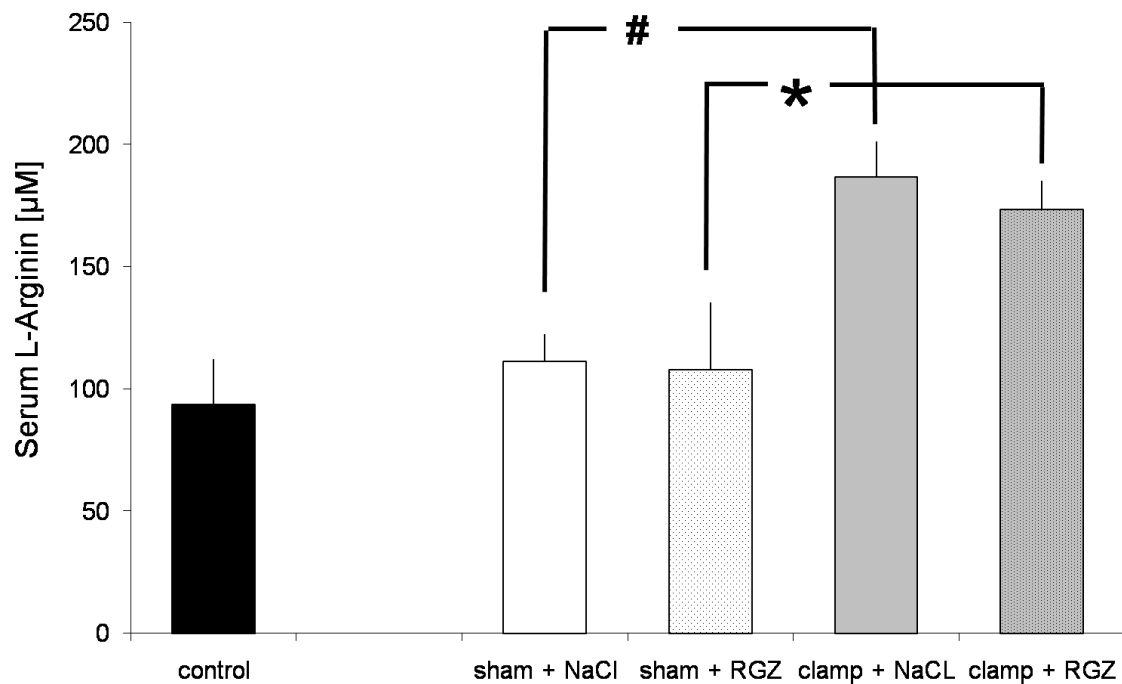


Abb. 29: Serumspiegel von L-Arginin in μM der Gruppen Kontrolle, Sham+NaCl, Sham+Rosiglitazon, Clamp+NaCl und Clamp+Rosiglitazon 24 Stunden nach der Erstoperation, $n=10$,

* = $p < 0,05$; # = $p < 0,05$

Analog zum ADMA-Serumspiegel ist der L-Arginin-Serumspiegel im akuten Nierenversagen signifikant erhöht und die Applikation von Rosiglitazon übt keinen direkten Einfluss auf den L-Arginin-Serumspiegel aus.

Hierbei ist der Anstieg von L-Arginin mit 60 % dreimal höher als der Anstieg von ADMA (20 %).

Folglich ist es möglich, dass der Mehranstieg des Substrates L-Arginin den Anstieg des Inhibitors ADMA überkompensiert.

Trotzdem könnte aufgrund der niedrigen Inhibitionskonstanten ($K_i = 0,9 \mu\text{M}$) von ADMA (Boeger2004) gegenüber eNOS der L-Arginin Anstieg nicht ausreichen, um die inhibitorische Wirkung von ADMA auszugleichen.

In der Literatur wird diese Frage beantwortet, indem ein Quotient aus L-Arginin / ADMA der NO-Produktion gegenübergestellt wird (Bode-Boeger2007, Tsikas2000).

Aus diesem Grund wurde für jedes Versuchstier der Quotient aus L-Arginin und ADMA berechnet.

3.6.2. Der L-Arginin/ADMA Quotient

Der Quotient aus L-Arginin und ADMA zeigte im Vergleich zu Sham+NaCl einen signifikanten Anstieg zu den Gruppen Clamp+NaCl und Clamp+RGZ um 40 % bzw 20 %. Die Sham+RGZ waren zu keiner der übrigen Gruppen signifikant unterschiedlich. Die Clamp-Gruppen waren untereinander nicht signifikant unterschiedlich. Die Kontrolltiere zeigten bis auf die Gruppe Sham+RGZ zu allen übrigen Gruppen einen signifikanten Unterschied. (siehe Abbildung 30 und Tabelle 3).

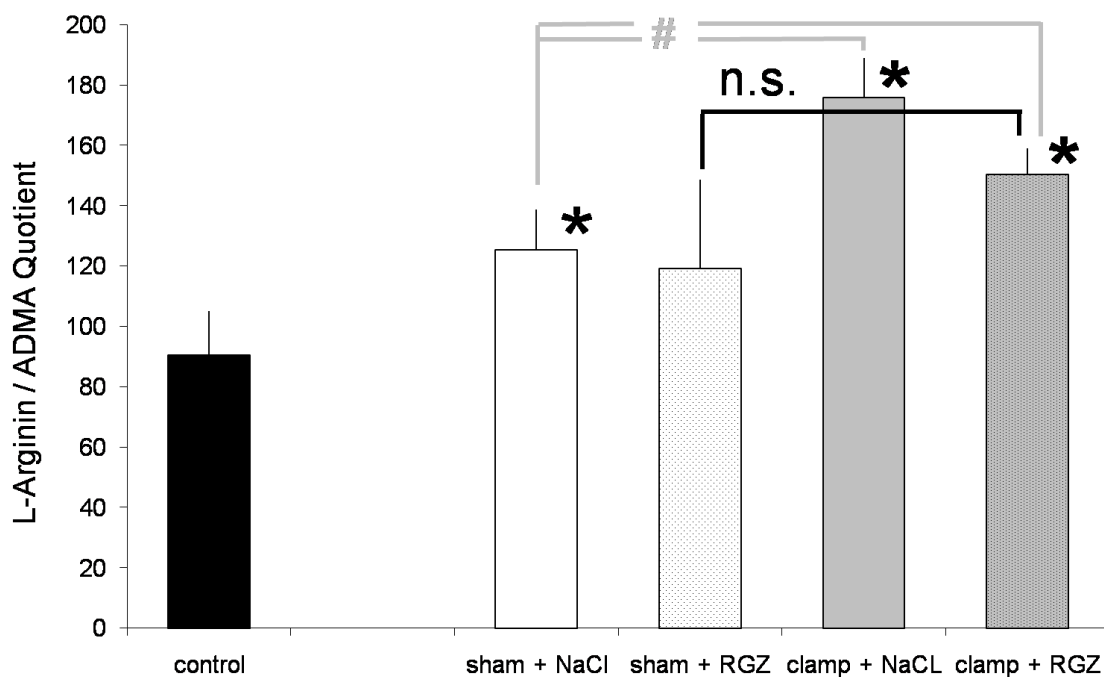


Abb. 30: Der Quotient aus L-Arginin und ADMA der Gruppen Kontrolle, Sham+NaCl, Sham+Rosiglitazon, Clamp+NaCl und Clamp+Rosiglitazon, 24 Stunden nach der Erstoperation, n=10.

= $p < 0,05$; * = $p < 0,05$ zu der Kontrollgruppe, n.s. = nicht signifikant

Das akute Nierenversagen bewirkt einen deutlichen Anstieg des L-Arginin/ADMA-Quotienten in den unbehandelten Tieren. Nach der Gabe von Rosiglitazon lässt sich zwischen Sham und Clamp-Gruppe kein signifikanter Unterschied nachweisen. Allerdings findet sich keine signifikante Herabregulation des Quotienten unter das Niveau der Shamtiere. Diese

Herabregulation zeigt sich in der Metaanalyse von Bode-Böger et al. als Hinweis auf eine effektive Hemmung der NO-Produktion (Bode-Boeger2007). Die Möglichkeit, dass durch die Applikation von Rosiglitazon ein potentiell protektiver Effekt durch den Anstieg des L-Arginin/ADMA Quotienten im akuten Nierenversagen verhindert wird, ist unter Bezugnahme der diesbezüglich zur Verfügung stehenden Literatur (Bode-Boeger2007) eher unwahrscheinlich. Dies wird in Kapitel 4 bewertet werden.

Um den inhibitorischen Effekt der errechneten Quotienten vergleichen zu können, wurde entsprechend der Formel aus der Metaanalyse von Tsikas et al. der inhibitorische Effekt im Bezug einen Normalwert/Referenzwert berechnet (Tsikas2000, Tabelle 3).

	Kontrolle	Sham+NaCl	Sham+RGZ	Clamp+NaCl	Clamp+RGZ
Mittelwert [L-Arginin] / [ADMA]	90,39	125,25	119,14	175,85	150,37
SEM	14,65	13,35	29,58	13,16	8,55
log([L-Arginin] / [ADMA])	1,96	2,10	2,08	2,25	2,18
<i>errechnete NO-Produktion in % zum Referenzwert</i>	96,99	103,92	102,86	111,14	107,81

Tab. 3: Der Quotient, „standard error of the mean“ (SEM), log₁₀ aus den Serumkonzentration von L-Arginin und ADMA der Gruppen Kontrolle, Sham+NaCl, Sham+Rosiglitazon, Clamp+NaCl und Clamp+Rosiglitazon 24 Stunden nach der Erstopoperation, mit n=10. Außerdem die errechnete NO-Produktion anhand der Formel:

“(log([L-Arginin]/[ADMA]) * 48,97) + 1,19620 = NO-Produktion in %” (Tsikas2000)

Auch der errechnete Vergleich des inhibitorischen Effekts anhand der NO-Produktion zeigt, dass es in den Clamp-Gruppen keinesfalls zu einer Verstärkung des Effekts kommt.

Zusammenfassend legen diese Ergebnisse nahe, dass in den Gruppen Clamp+NaCl und Clamp+RGZ - unabhängig von der eNOS-Expression - keine wesentliche Einschränkung der Aktivität von eNOS durch ADMA vorliegt.

Der Anstieg von ADMA im akuten Nierenversagen kann durch DDAH 1 erklärt werden. Die Ursache für den Anstieg von Serum-L-Arginin ist unklar. Aus diesem Grund wurde im nächsten Schritt die Serumkonzentration eines Inhibitors des zellulären L-Arginin-Transporters untersucht.

3.7. SDMA

Symmetrisches-Dimethyl-Arginin (SDMA) ist ein strukturelles Isomer zu ADMA. Im Gegensatz zu diesem wird es nicht metabolisiert sondern überwiegend renal ausgeschieden. In Studien zeigt es eine enge Korrelation zur Nierenfunktion (Kielstein2006). SDMA ist ein kompetitiver Inhibitor des L-Arginin-Transporters und mindert somit die intrazelluläre Aufnahme von L-Arginin.

Der Serumspiegel von SDMA war im akuten Nierenversagen signifikant erhöht. Die Steigerung betrug ca. 380 % in der Clamp+NaCl-Gruppe (1,06 μM +/- 0,14 μM) und ca. 400 % in der Clamp+RGZ-Gruppe (1,1 μM +/- 0,17 μM) jeweils zu der korrespondierenden Sham-Gruppe (0,28 μM +/- 0,02 μM für Sham+NaCl bzw. 0,28 μM +/- 0,03 μM für Sham+RGZ). Im Bezug auf die Kontrollgruppe (0,49 μM +/- 0,11 μM) betrug der Anstieg 215 % bzw. 220 % (Clamp+NaCl bzw. Clamp+RGZ). Im Vergleich zu den Kontrolltieren war die SDMA-Konzentration der Sham-Gruppen um jeweils 43 % signifikant erniedrigt (Abbildung 31).

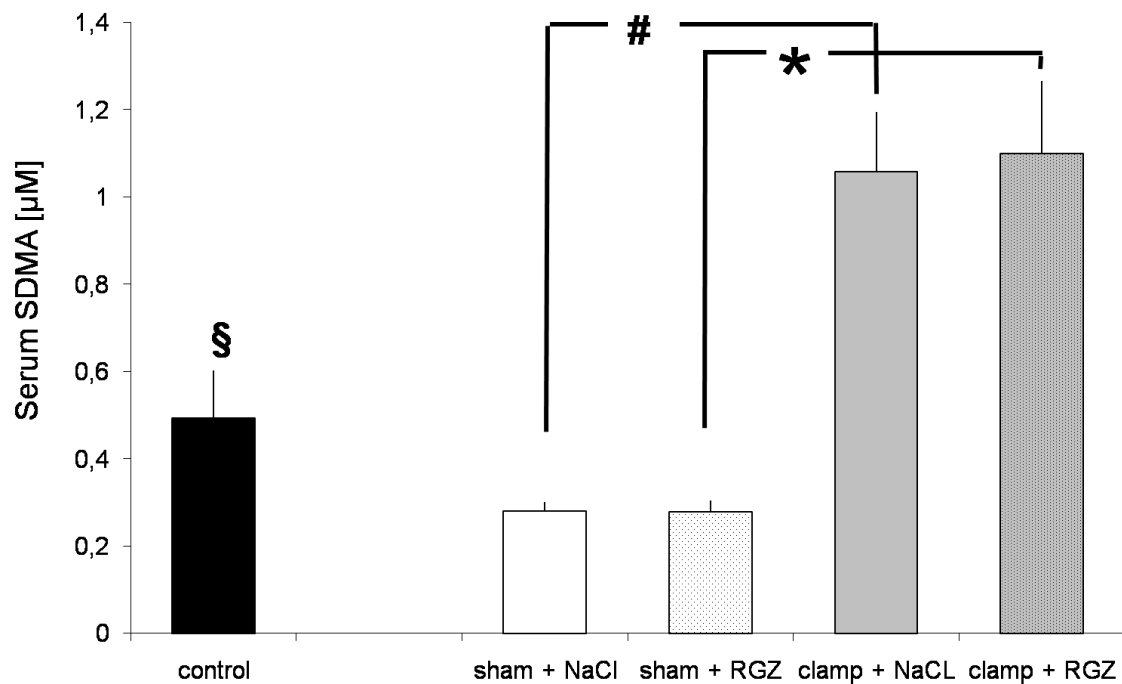


Abb. 31: Serumspiegel von SDMA in µM der Gruppen Kontrolle, Sham+NaCl, Sham+Rosiglitazon, Clamp+NaCl und Clamp+Rosiglitazon 24 Stunden nach der Erstoperation, n=10.

* = p<0,05; # = p<0,05; § = p<0,05 zu allen anderen Gruppen

Der Serum-SDMA Spiegel steigt im akuten Nierenversagen unabhängig von Rosiglitazon im Vergleich mit den Shamgruppen um das vierfache an. Im Vergleich mit der Kontrollgruppe steigt der Spiegel um mehr als das doppelte an. Für die Herabregulation der Shamgruppen findet sich aktuell kein adäquater Erklärungsansatz.

Der Anstieg von Serum-SDMA ist deutlich ausgeprägter als der Anstieg von ADMA oder L-Arginin. Der deutliche Anstieg könnte zu einer Hemmung des zellulären L-Arginin-Transporters führen. Dadurch könnte es parallel zu einem extrazellulären Anstieg des Serum-L-Arginins zu einem intrazellulären Substratmangel kommen. Dieser Mangel an L-Arginin könnte erklären, warum es trotz einer deutlich erhöhten eNOS-Expression durch Rosiglitazon nur zu einer schwachen Mehrproduktion von endotheliale NO kommt.

3.8. Zusammenfassung der Ergebnisse

Die Gabe von Rosiglitazon bewirkt im ischämischen akuten Nierenversagen eine funktionelle Verbesserung der Inulin- und PAH-Clearance. Die PAH-Nettosekretion steigt unter Rosiglitazon an, was für eine zusätzliche Wirkung von Rosiglitazon auf die tubuläre Funktion spricht. Als Ursache für die Verbesserung wird ein Einfluss auf das NO-System vermutet.

Rosiglitazon besitzt keinen Einfluss auf die Phosphorylierung von eNOS an Ser1177 bzw. von Akt an Ser473 und nur einen inhibitorischen Einfluss auf die Phosphorylierung von eNOS an Ser633. Allerdings steigert Rosiglitazon die im akuten Nierenversagen deutlich reduzierte mRNA-Expression von eNOS. Durch den glomerulär protektiven Effekt von eNOS kann die Clearance-Verbesserung unter Rosiglitazon erklärt werden. Hierbei ist jedoch eine Diskrepanz zwischen dem deutlichen Anstieg der eNOS-mRNA und der nur schwachen funktionellen Verbesserung auffällig. Diese kann durch die geringere Phosphorylierung von eNOS an Ser633 unter Rosiglitazon nicht vollständig erklärt werden.

Die Gabe von Rosiglitazon führt zu einer deutlichen Abmilderung des Anstiegs der iNOS-mRNA im ischämischen akuten Nierenversagen. Aufgrund des daraus resultierenden abgeschwächten tubulär-zytotoxischen Effektes von iNOS kann die Besserung der PAH-Nettosekretion unter Rosiglitazon erklärt werden. Zusätzlich kann iNOS über NO einen direkten Einfluss auf eNOS ausüben und so auch dessen Regulation erklären.

Die Inflammationsreaktion und der Zellschaden im akuten Nierenversagen werden durch Rosiglitazon abgemildert, was sich in einer reduzierten Infiltration von ED-1 positiven Zellen und einer verminderten Expression der Apoptosemarkers CC3 widerspiegelt. Da eine abgeschwächte Inflammationsreaktion und verringerter Anstieg von iNOS zusätzlich die Aktivität von eNOS steigern, bleibt die Diskrepanz zwischen Regulation von eNOS und der mäßigen funktionellen Verbesserung bestehen bzw. wird verschärft.

Asymmetrisches Dimethylarginin (ADMA) hemmt als L-Arginin-Derivat eNOS kompetitiv. Es steigt im akuten Nierenversagen an, wird jedoch von Rosiglitazon nicht reguliert. Dimethylarginin Diaminohydrolase (DDAH) baut

ADMA ab. Während die Isoform II nicht reguliert ist, fällt die Expression der Isoform I im akuten Nierenversagen genau um den Anteil ab, um den ADMA ansteigt und könnte so den Anstieg von ADMA erklären. Das an der Entstehung von ADMA maßgeblich beteiligte Enzym Proteinargininmethyltransferase 1 (PRMT 1) zeigt abhängig von der Rosiglitazon-Applikation jedoch unabhängig von der Induktion des Nierenversagens eine signifikante Herabregulation.

Der Serumspiegel von L-Arginin, welches das Substrat der eNOS darstellt, steigt im akuten Nierenversagen signifikant an. Dieser Anstieg ist deutlich höher als der Anstieg des „kompetitiven Gegenspielers“ ADMA, was sich auch im Anstieg des Quotienten aus L-Arginin und ADMA im akuten Nierenversagen widerspiegelt. Aufgrund dieser Tatsache scheint es unwahrscheinlich, dass ADMA einen entscheidenden inhibitorischen Einfluss auf das unter Rosiglitazon gesteigerte eNOS im akuten Nierenversagen ausübt.

Symmetrisches Dimethylarginin (SDMA) hemmt den transzellulären Transport von L-Arginin. Die Serumkonzentration von SDMA steigt im akuten Nierenversagen deutlich an und könnte daher für den L-Arginin Serumanstieg verantwortlich sein. Zudem könnte es hierdurch zu einem intrazellulären Mangel an L-Arginin kommen. Aus diesem Grunde könnte trotz deutlich erhöhter eNOS-Expression unter Rosiglitazon aufgrund des Substratmangels nur eine geringe Mehrproduktion von NO vorliegen.

Hierdurch könnte die Diskrepanz zwischen der deutlichen Heraufregulation von eNOS und der nur mäßig funktionellen Verbesserung unter Rosiglitazon erklärt werden.

4. Diskussion

4.1. Methodik

Das angewandte Tiermodell des induzierten renalen Ischämie-Reperfusion Schadens durch beidseitiges Abklemmen der arteriae renales ist im Institut etabliert und standardisiert. Die komplexen Messverfahren der Inulin- und der PAH-Clearance entsprechen ebenfalls einem standardisierten Protokoll, wodurch eine gute Reproduzierbarkeit mit hinreichender Genauigkeit gewährleistet ist. Die weiteren Analysen wurden durch etablierte und standardisierte Methoden durchgeführt, die in mehreren Publikationen der Arbeitsgruppe veröffentlicht sind (Raff2005, Schneider2003, Schneider2007).

4.2. Nierenfunktion

Zunächst wurde in der vorliegenden Arbeit die Wirkung von Rosiglitazon im akuten ischämischen Nierenversagen auf die Nierenfunktion untersucht. Hierfür wurde ein etabliertes Rattenmodell herangezogen. Der Abfall von Inulin- und PAH-Clearance in der Ischämie entspricht in seinem Ausmaß dem Abfall vorangegangener Arbeiten (Schneider2003, Schneider2007, Fenske2005).

Eine erniedrigte Inulin – Clearance weist auf eine reduzierte GFR und damit auf einen glomerulären Nierenschaden in der Ischämie hin (Schrier2004).

Die Gabe von Rosiglitazon besserte im ischämischen Nierenschaden sowohl die Inulin – Clearance als auch die PAH – Clearance und damit die GFR und den RPF um mehr als das doppelte. Allerdings bestand trotz Besserung der Nierenfunktion unter Rosiglitazon eine Reduktion der jeweiligen Clearance um ca. 70 % vom Ausgangswert.

Die Studie von Sivarajah et al. zeigt, dass durch die Gabe von Rosiglitazon im akuten ischämischen Nierenschaden der Abfall der Creatinin-Clearance von 90 % auf 80 % vom Ausgangswert gemindert wird (Sivarajah2003). Die Creatinin-Clearance stellt eine Berechnungsgrundlage der GFR wie die Inulin-Clearance (Kuhlmann2008). Deshalb bestätigen die vorliegenden Ergebnisse die Studie

von Sivarajah et al.. In der Studie von Chatterjee et al. wird durch einen PPAR γ -Agonisten in einem Modell des Ischämie-Reperfusionsschadens bei Ratten lediglich eine Verbesserung der Creatinin-Clearance von 98 % Abfall auf 94 % des Ausgangswertes erreicht. Dieser Unterschied könnte in der unterschiedlichen Reperfuionszeit und in der Verwendung von 15dPGJ₂ als PPAR γ -Agonisten liegen, der noch weitere PPAR γ -unabhängige Funktionen besitzt und zudem PPAR γ nicht so stark aktiviert wie Rosiglitazon (Chatterjee2004a). In der Studie von Sivarajah et al. korreliert das Ausmaß der Nierenfunktionsverbesserung mit der Spezifität und der Konzentration des PPAR γ -Agonisten (Sivarajah2003).

In den zitierten Arbeiten (Chatterjee2004a, Sivarajah2003) gilt die gebesserte Creatinin-Clearance als Hinweis auf eine Verringerung des glomerulären Schadens. Analog kann man folgern, dass Rosiglitazon den glomerulären Schaden im akuten ischämischen Nierenversagen reduziert.

Im akuten Nierenversagen war die PAH – Clearance um über 90 % reduziert, was einer Reduktion des renalen Plasmaflusses entspricht. Da ein verminderter RPF zu einer eingeschränkten GFR führt, ist es verständlich, dass die GFR und RPF in einem ähnlichen Ausmaß reduziert werden (Schneider2007).

Eine Minderung der PAH – Clearance kann nicht nur aus einer Minderung der renalen Perfusion sondern auch aus einer Abnahme der Sekretion von PAH im proximalen Tubulus resultieren. Um diese Sekretion zu bestimmen, wird die PAH – Nettosekretion aus PAH – Clearance und GFR berechnet (Schneider2007). Die PAH – Nettosekretion war in der Ischämie reduziert, was den Ergebnissen vorangegangener Arbeiten entspricht und als Hinweis für eine tubuläre Funktionseinschränkung gewertet werden kann (Schneider2007, Corrigan1999). Insofern bestätigt das Modell die in mehreren Reviews publizierte Ansicht, dass der Schaden in der renalen Ischämie sowohl eine glomeruläre als auch eine tubuläre Komponente besitzt (Lameire2005c, Schrier2004).

Durch die Gabe von Rosiglitazon wird im akuten Nierenversagen die PAH-Nettosekretion verdreifacht. Folglich scheint Rosiglitazon eine protektive Wirkung auf den Tubulus auszuüben. Im Vergleich zur Kontrollgruppe ist PAH-

Nettosekretion in der Clamp+RGZ Gruppe immer noch deutlich um über 70% reduziert.

In verschiedenen Studien wird die fraktionelle Natrium-Exkretion als Indikator eines tubulären Schadens im ischämischen akuten Nierenversagen herangezogen (Chatterjee2004a, Letavernier2005, Sivarajah2003). Die fraktionelle Natrium-Exkretion wird im ischämischen akuten Nierenversagen bei Sivarajah et al. durch Rosiglitazon und bei Chatterjee et al. durch $15\Delta\text{PGJ}_2$ jeweils um die Hälfte reduziert und bestätigt damit die Hypothese einer deutlich geringeren tubulären Schädigung durch Rosiglitazon. Ebenso zeigt sich in Zusammenschau dieser Studien und der vorliegenden Arbeit, dass dieser tubuläre Effekt mit einer Verbesserung um den Faktor 3,1 stärker ist als der glomeruläre Effekt mit einer Verbesserung um den Faktor 2,6.

Da sich die PAH-Clearance um den Faktor 4,3 verbessert, scheint neben der gesteigerten PAH-Nettosekretion auch die renale Durchblutung durch die Gabe von Rosiglitazon gesteigert zu sein.

Zusammenfassend bessert die Gabe von Rosiglitazon im akuten ischämischen Nierenversagen sowohl glomeruläre und tubuläre Funktionsparameter als auch die Perfusion.

Nachdem die Wirksamkeit von Rosiglitazon im ischämischen akuten Nierenversagen sowohl auf glomerulärer als auch auf tubulärer Ebene gezeigt wurde, war der Wirkmechanismus von Rosiglitazon Gegenstand der folgenden Untersuchungen.

Naheliegender ist eine Wirkung von Rosiglitazon über den Peroxisomeproliferator-activated receptor γ (PPAR γ). Hierfür sprechen mehrere Argumente: Wie bereits in der Einleitung beschrieben, werden Rezeptoren vom Typ PPAR γ im renalen Gewebe exprimiert (Iglesias2006). Diese Expression wird im akuten ischämischen Nierenversagen verstärkt (Yoshimura2004). Rosiglitazon ist der potenteste PPAR γ -Agonist. Die nephroprotektive Wirkung von PPAR γ -Agonisten im ischämischen Nierenversagen kann durch spezifische Blockade von PPAR γ komplett aufgehoben werden (Collino2005).

Andererseits finden sich in der Literatur in vitro Studien, die bei entsprechend hohen Konzentrationen von Rosiglitazon einen Aktivierungsmechanismus beschreiben, der unabhängig von PPAR γ ist (Berry2005): Dieser Mechanismus verläuft über die Phosphorylierung oder Dephosphorylierung von Signalproteinen wie der Mitogen-activated-protein (MAP)-Kinase (Burgermeister2007), EPK1/2, GSK-3 β (Lee2009) oder Akt. Einer solchen Aktivierung werden antiapoptotische (Burgermeister2007) oder antiproliferative (Lee2009) Effekte zugeschrieben.

Bezüglich Akt konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass Rosiglitazon im ischämischen Nierenversagen keine erhöhte Phosphorylierung an Ser495 und damit keine Aktivierung bewirkt.

Denkbar ist zudem, dass Rosiglitazon neben PPAR γ nicht-selektiv weitere Isoformen von PPAR wie α , β oder δ aktiviert. Gerade die Aktivierung von PPAR β/δ wirkt im ischämischen Reperfusionsschaden der Nieren protektiv (Letavernier2005). Zudem wird in proximalen Tubuluszellen mehr PPAR β als PPAR γ exprimiert (Iglesias2006). In der Literatur finden sich keine Hinweise auf eine solche nicht-selektive Aktivierung: Rosiglitazon wird nicht nur als hochpotent sondern auch als hochselektiv für die spezifische Bindung an PPAR γ charakterisiert (Iglesias2006). Eine indirekte Aktivierung wäre allerdings denkbar: Die Phosphorylierung der MAP-Kinase führt zu einer höheren Aktivität der PPAR α Isoform (Burgermeister2007). Diese ist allerdings im Ischämie-Reperfusionsschaden nur sehr schwach exprimiert (Sivarajah2003).

Die Tatsache, dass eine spezifische PPAR γ -Blockade eine Besserung durch Agonisten verhindert (Collino2005) und die fehlende Aktivierung des alternativen Wirkmechanismus von Rosiglitazon über Akt machen eine PPAR γ -abhängige Wirkung wahrscheinlich. Eine Beteiligung von PPAR γ -unabhängigen Wirkungsmechanismen kann jedoch nicht ausgeschlossen werden.

4.3. Rosiglitazon und eNOS

In der Literatur finden sich verschiedene Erklärungen für eine nephroprotektive Wirkung durch PPAR γ -Agonisten. Diese lassen sich in eine hämodynamisch-vasodilatatorische und in eine antiinflammatorische Komponente unterteilen (Iglesias2006b).

Für die hämodynamischen Effekte wird eine Senkung der Insulin-Resistenz, eine Regulation des Salz-/Wasserhaushaltes, eine direkte Relaxationswirkung in Endothel- und Gefäßmuskelzellen und eine Signalmolekül-vermittelte Relaxation verantwortlich gemacht (Iglesias2006b):

Im Rattenmodell korreliert eine verbesserte Insulinsensitivität mit einer verbesserten vasodilatatorischen Reaktion (Kotchen1997). Beim Menschen ist der Zusammenhang bestätigt, wobei auch eine zentrale Sympathikusaktivierung angenommen wird (Yosefy2004). In beiden Studien erfolgt die Applikation des PPAR γ -Agonisten über Wochen bis Monate zum Erreichen der gebesserten Insulinsensitivität. Deshalb schien dieser Wirkmechanismus bei der in dieser Arbeit durchgeführten einmaligen Applikation eher unwahrscheinlich zu sein und wurde nicht weiter untersucht.

In Diabetesratten kann Rosiglitazon über einen längeren Applikationszeitraum die Natriurese bessern und damit zu einem niedrigerem Blutdruckprofil führen (Khan2005). In gesunden Ratten steigt nach Gabe von Rosiglitazon über drei Tage die Expression von Aquaporinen und Na-K-2Cl-Cotransportern. Es kommt zu einer vermehrten Salz und Wasserretention (Song2004). Eine Beteiligung dieses Mechanismus kann nicht ausgeschlossen werden. Die Transporterexpression im distalen Tubulus und Sammelrohr spielt keine prominente Rolle in der Pathophysiologie des ischämischen Nierenschadens (Bonventre2003). Deshalb wurde dieser Wirkmechanismus in der vorliegenden Arbeit nicht weiter untersucht.

PPAR γ -Agonisten besitzen eine direkte Relaxationswirkung auf Gefäße, die durch eine Aktivierung von Plasminogen-activator-inhibitor Typ 1 (PAI-1) und

durch Aktivierung von Metalloproteinasen (MMP-9) ermöglicht wird (Marx1998, Marx1999). Beide Proteine spielen eine Rolle in der Pathophysiologie der Atherosklerose, es gibt keine Hinweise auf ihre Beteiligung im akuten Nierenversagen.

Einige PPAR γ -Agonisten besitzen durch Aktivierung der Prostaglandine PGI $_2$ und PGE $_2$ eine indirekte vasodilatierende Wirkung. Dieser Effekt findet sich bei Rosiglitazon nicht (Walker1998).

PPAR γ -Agonisten können in Endothelzellen die Produktion des Sauerstoffradikals Superoxid (O $_2^-$) verringern. Dies geschieht über eine vermehrte Expression der Superoxiddismutase (SOD), die als „Radikalfänger“ fungiert, und über eine verringerte Expression von Nicotinamidadenindinucleotidphosphat (NADPH), das an der Synthese von O $_2^-$ beteiligt ist (Abb. 30). Die verringerte Konzentration von O $_2^-$, das hochreaktiv an NO bindet, führt zu einer höheren Bioverfügbarkeit an vasodilatierendem NO. Dieser Mechanismus wurde in vitro (Hwang2005), im Rattenmodell des Hypertonus (Potenza2009) und bei Patienten mit Diabetes mellitus II (Bagi2004) nachgewiesen (Abbildung 32).

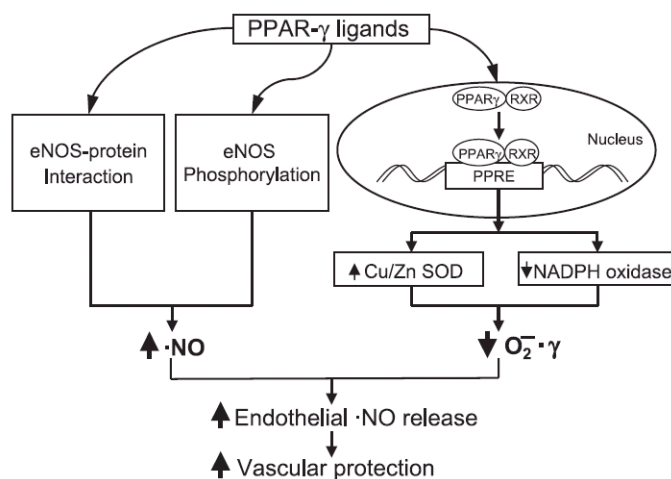


Abb. 32: Einflussmöglichkeiten der PPAR γ -Agonisten auf eNOS und die endotheliale NO-Freisetzung nach Hwang2005

Wie aus der Abbildung ersichtlich, können PPAR γ -Agonisten die Produktion von Stickstoffmonoxid (NO), einem Signalmolekül mit vasodilatierendem Effekt, auch direkt steigern: Die Aktivität der endothelialen NO-Synthase (eNOS) wird

zum einen durch Proteininteraktionen zum anderen durch Phosphorylierungen (Cho2004) erhöht.

Außerdem wird die Expression der endothelialen NO-Synthase (eNOS) durch Gabe von PPAR γ -Liganden erhöht (Calnek2003).

Speziell Rosiglitazon steigert in vitro durch eine vermehrte Interaktion zwischen dem heat shock protein 90 (hsp90) und eNOS sowie über eine Phosphorylierung von eNOS an Ser1177 die NO-Produktion (Polikandriotis2005). Der Phosphorylierungsschritt ist bei Rosiglitazon zum Teil unabhängig von der Aktivierung von PPAR γ . Er wird über die Proteinkinase AMPK („AMP-aktivierte Proteinkinase“) vermittelt (Boyle2008).

Zusammenfassend ist sowohl die direkte als auch die indirekte vasodilatorische Wirkung der PPAR γ -Agonisten mit dem Molekül NO verknüpft. Die Bedeutung des Zusammenhanges zwischen PPAR γ , NO und dem Ischämie-Reperfusionsschaden wird dadurch unterstrichen, dass im Modell des ischämischen Myokardschadens Rosiglitazon in eNOS-Knockout Mäusen keinen protektiven Effekt aufweist (Gonon2007).

Ebenso existieren eine Vielzahl von Studien und Reviews, welche die prominente Rolle von NO im akuten ischämischen Nierenversagen unterstreichen (Goligorsky2004). Eine pharmakologische Blockade von eNOS (Chintala1993) oder die Suppression des eNOS kodierenden Gens (Wang2004) verursachen im Tiermodell der Ischämie und der Sepsis einen deutlich stärkeren Nierenschaden im Vergleich zu Kontrollen.

Zuerst wurde untersucht, ob sich die in vitro belegte Stimulation der NO Produktion durch eine Phosphorylierung der eNOS an Ser1177 (Polikandriotis2005, Boyle2008) in vivo bestätigt: Im Rattenmodell des ischämischen Nierenversagens konnte kein Unterschied bezüglich der Expression von p-eNOS(Ser1177) zwischen unbehandelten und mit Rosiglitazon behandelten Tieren gefunden werden.

Dies steht im Einklang mit der Studie von Ye et al., die im Rattenmodell des Herzinfarktes keine Steigerung der Phosphorylierung an eNOS Ser 1177 durch Pioglitazon feststellen konnte (Ye2006).

Das Ergebnis widerspricht anderen Versuchen im Tiermodell mit PPAR γ -Agonisten. So wird in ischämisch geschädigten Herz- und Muskelzellen der Maus durch Pioglitazon eine signifikante Steigerung der p-eNOS-Ser1177 mit entsprechendem protektivem Effekt induziert (Huang2008, Ye2008). Der Unterschied ist möglicherweise im untersuchten Gewebe oder der verwendeten Spezies begründet. Außerdem lösen unterschiedliche PPAR γ -Agonisten bei der Bindung an den Rezeptor unterschiedliche Konformationsänderungen aus. Dies führt durch Rekrutierung unterschiedlicher Co-Aktivatoren oder Co-Repressoren zu unterschiedlichen Signalwegen (Camp2000).

In der Studie von Gonon et al. führt die Gabe von Rosiglitazon im Mausmodell des ischämischen Myokardschadens zu einer Phosphorylierung der p-eNOS an Ser1177 (Gonon2007). Im Unterschied zu den anderen genannten Studien wird dieselbe Substanz wie in der vorliegenden Arbeit verwendet – allerdings in einer deutlich höheren Dosierung. Die hohe Dosierung von 3 mg/kg Körpergewicht könnte zu einer Aktivierung PPAR γ -unabhängiger Mechanismen führen. Ein Beispiel ist die AMPK-Aktivierung, die mit einer Phosphorylierung der eNOS an Ser1177 assoziiert ist (Boyle2008).

Auch die Phosphorylierung der eNOS an Ser 633 bewirkt eine Aktivitätssteigerung. Der Anstieg der NO-Produktion ist jedoch im Vergleich zu p-eNOS Ser1177 deutlich geringer (Michell2002). Bei Pioglitazon, einem schwachen PPAR γ -Agonisten, ist im Rattenmodell der Myokardischämie eine verstärkte Phosphorylierung an Ser 633 nachgewiesen (Ye2008). Allerdings liegt bei Ye et al. gleichzeitig eine verstärkte Phosphorylierung an eNOS Ser1177 und eine Expressionssteigerung von eNOS vor. Es bleibt unklar, welcher Anteil der protektiven Wirkung von Pioglitazon auf die Phosphorylierung von eNOS Ser633 zurückzuführen ist.

Im vorliegenden Rattenmodell des Nierenversagens war die Expression von p-eNOS Ser 633 in der Clamp+RGZ Gruppe im Vergleich zu den übrigen

Gruppen um über 50% reduziert. Diese Herabregulation wird in der vorliegenden Arbeit erstmals beschrieben. In der Literatur findet sich kein Erklärungsansatz für den Einfluss von Rosiglitazon auf p-eNOS Ser 633 im akuten Nierenversagen.

Das Signalprotein Akt ist Bestandteil mehrerer Signalkaskaden, an deren Ende die Phosphorylierung oder Dephosphorylierung von eNOS an verschiedenen Aminosäurepositionen steht (Michell2002). PPAR γ -Liganden bewirken in vitro und auch in vivo über eine Phosphorylierung von Akt eine Phosphorylierung von eNOS, was in einem Produktionsanstieg von NO resultiert (Cho2004, Huang2008). Die Messung der Expression p-Akt kann deshalb als Screeningparameter für eine Beeinflussung der Phosphorylierungskaskade gesehen werden.

In der vorliegenden Arbeit zeigte sich ein Anstieg der Expression von p-Akt im akuten Nierenversagen von den Gruppen Sham+NaCl bzw. Sham+RGZ um ca. 100 % auf die jeweiligen Clamp-Gruppen. Dieser Wert stimmt tendenziell mit anderen Arbeiten am selben Rattenmodell des ischämischen Nierenversagens überein, die bei jeweils verschiedenen Ischämie- und Reperfusionzeiten einen Anstieg des p-Akt zwischen 30 % (Park2004), 100 % (Li2008) und 250 % (Xie2006) zeigen. Somit ist eine vermehrte Expression von p-Akt abhängig von der Induktion eines ischämischen Nierenschadens aber unabhängig von der Gabe von Rosiglitazon. In der Literatur wird ein protektiver Effekt der p-Akt durch Aktivierung von Phosphorylierungskaskaden des NO-Signalweges vermutet (Satake2008), der in der vorliegenden Arbeit nicht nachgewiesen werden konnte. Außerdem werden der p-Akt im ischämischen akuten Nierenversagen protektive antiapoptotische Effekte zugeschrieben (Park2004, Li2008, Xie2006).

Zusammenfassend scheint Rosiglitazon seine protektive Wirkung im akuten ischämischen Nierenversagen nicht über eine gesteigerte Phosphorylierung von Akt oder eNOS auszuüben.

Im nächsten Schritt wurde der Effekt von Rosiglitazon auf die eNOS-Expression auf mRNA-Ebene untersucht: Die Gabe von Rosiglitazon übt keinen Effekt auf die Expression von eNOS-mRNA in den Sham-Gruppen aus. In der Clamp+NaCl Gruppe war die Expression um den Faktor 4 signifikant reduziert. In der Clamp+RGZ Gruppe zeigte sich der Abfall der Expression von eNOS signifikant abgeschwächt: Die Expression reduzierte sich in der Clamp+RGZ Gruppe im Vergleich zur Sham+RGZ Gruppe um den Faktor 1,8. Rosiglitazon scheint im akuten Nierenversagen die Verminderung der Expression von eNOS-mRNA zu verhindern.

Die Arbeit von Chen et al. zeigt, dass die Regulation der eNOS-mRNA im Rattenmodell des akuten renalen Ischämie-Reperfusionsschadens exakt der Regulation von eNOS auf Proteinebene entspricht (Chen2008). Deshalb wurde in der vorliegenden Arbeit die Darstellung der Regulation der eNOS-mRNA als hinreichender Nachweis für die Regulation des eNOS-Proteins angesehen.

Vergleicht man dieses Ergebnis mit anderen in vivo und in vitro Studien, so zeigt sich, dass in den meisten Arbeiten keine Änderung der eNOS-Expression durch PPAR γ -Liganden erreicht wird (Tabelle 4, nächste Seite).

Autor	Spezies	Modell	PPARγ- Agonist	eNOS- Expression
Cho2004	BAEC		Troglitazon	---
Calnek2003	PAEC		15d-PGJ2, Ciglitazon	---
Polikandriotis2005	HUVEC		15d-PGJ2, Ciglitazon, Rosiglitazon	---
Gonon2007	Maus	Myokardischämie	Rosiglitazon	---
Wakino2005	Ratte	Bluthochdruck	Pioglitazon	---
Ye2006	Ratte	Myokardischämie	Pioglitazon	---
Ryan2004	Maus	Bluthochdruck	Rosiglitazon	---
Ye2008	Maus	Myokardischämie	Pioglitazon	+++ (RNA)
Song2004	Ratte	Normaltiere	Rosiglitazon	+++

Tab. 4: Einfluss von PPAR γ -Agonisten auf die Expression von eNOS in verschiedenen Versuchsmodellen

Legende: HUVEC = human umbilical vein endothelial cells, BAEC = Bovine aortic endothelial cells; PAEC = porcine pulmonary artery endothelial cells; +++ = Anstieg der eNOS-Expression; --- = keine Veränderung der eNOS-Expression

Allerdings wird in keiner der aufgeführten Arbeiten Rosiglitazon im Ischämie-Reperfusionsschaden der Niere getestet.

In eben diesem Modell spielt die Expression von eNOS als Hinweis auf die Produktion von NO eine wichtige Rolle:

Publikationen (Schramm2002, Foglieni2006) mit dem Tiermodell des ischämischen Nierenversagens zeigen, dass der Abfall der renalen Funktion mit einem Abfall an NO im Urin und einer qualitativen Minderexpression von eNOS assoziiert ist. Kwon et al. (Kwon2009) untersuchten Transplantatnieren kurz nach der Implantation als Modell des Ischämie-Reperfusionvorganges im akuten Nierenversagen beim Menschen. Sie konnten nachweisen, dass in den Transplantatnieren die NO Produktion signifikant niedriger ist, als in Biopsien

von Kontrollnieren. In Korrelation hierzu stand eine signifikante Mindereexpression von eNOS.

Diese Herabregulation von eNOS im akuten Nierenversagen fand sich auch auf RNA-Ebene in der vorliegenden Arbeit im unbehandelten akuten ischämischen Nierenversagen.

Viele Maßnahmen, die im Tiermodell zu einer Minderung des ischämischen Reperfusionsschadens der Niere führen, sind mit einer verstärkten Expression von eNOS assoziiert: Durch ischämisches Prä- und Postkonditionieren (Liu2007, Yamashita2003), durch Gabe von Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) (Foglieni2006) oder Ozon (Chen2008) kann annähernd eine Verdopplung der Expression von eNOS erreicht werden. In der vorliegenden Arbeit konnte durch die Gabe von Rosiglitazon sogar mehr als eine Verdopplung der eNOS Expression im Vergleich zur Clamp+NaCl erreicht werden.

Entsprechend den in der Einleitung dargelegten pathophysiologischen Zusammenhängen wird dem durch eNOS produzierten NO vor allem ein vaskulär/glomerulärer Effekt im akuten ischämischen Nierenversagen zugeschrieben (Schrierer2004).

Deshalb kann die verstärkte Expression der eNOS-mRNA den funktionellen Effekt von Rosiglitazon sowohl auf die glomeruläre Filtrationsleistung (Inulin-Clearance) als auch die Nierendurchblutung (PAH-Clearance) im akuten Nierenversagen erklären.

In den zitierten Studien war allerdings die Steigerung der eNOS-mRNA mit einer sehr deutlichen Besserung der renalen Funktion auf bis zu 2/3 der ursprünglichen Funktion der entsprechenden Shamtiergruppe assoziiert. In der vorliegenden Arbeit erreichte zwar das eNOS-Expressionsniveau in der Clamp+RGZ Gruppe ca. 70 % des Niveaus der der Sham-Tiere. Trotzdem bestand immer noch eine deutliche Reduktion der PAH- und Inulin- Clearance auf ca. 20 % des Niveaus der Sham-Gruppen.

Als nächsten Schritt galt es Hinweise zu suchen, die den Kontrast zwischen dem deutlichen Expressionsanstieg von eNOS unter Rosiglitazon und der geringen funktionellen Verbesserung erklären konnten.

Eine mögliche Erklärung ergab sich aus bereits gewonnenen Ergebnissen. Durch Rosiglitazon wird die Phosphorylierung an eNOS Ser633 im akuten Nierenversagen herabgesetzt. Dies könnte, trotz einer verstärkten Expression von eNOS, zu einer verminderten Aktivität mit geringer Produktion von NO führen. Allerdings scheint es unwahrscheinlich, dass diese Tatsache die alleinige Erklärung der erwähnten Diskrepanz darstellt: Zum einen ist der prozentuale Anstieg der eNOS-mRNA Expression (über 100%) unter Rosiglitazon deutlich höher als der Abfall der p-eNOS Ser633 Expression (ca 50%). Hierbei muss der Unterschied zwischen der Proteinebene von p-eNOS Ser633 und der mRNA-Ebene von eNOS berücksichtigt werden, was diesen direkten Vergleich in seiner Aussagekraft einschränkt. Zum anderen bewirkt p-eNOS Ser633 im Vergleich zum nicht-phosphorylierten Enzym nur eine schwache Steigerung der Aktivität (Michell2002). Im Umkehrschluss dürfte durch dessen Herabregulation die Aktivität nur schwach gemindert werden.

Aufgrund dieser Überlegungen blieb die Frage nach der Ursache für die Diskrepanz zwischen schwachen funktionellem und deutlichen regulatorischem Effekt auf mRNA-Ebene im akuten Nierenversagen weiterhin ungeklärt.

Ein weiterer ungeklärter Aspekt ist die tubuläre Besserung unter Rosiglitazon: Während sich die Besserung der Inulin- und PAH-Clearance unter Rosiglitazon auf die glomerulär-protective Wirkung der vermehrten eNOS-Expression zurückführen lässt, weist die erhöhte PAH-Nettosekretion wie in Kapitel 4.2. dargelegt auf eine verbesserte Tubulusfunktion hin.

Die Untersuchung des iNOS-Signalweges im nächsten Schritt war naheliegend, da iNOS im akuten Nierenversagen - wie in der Einleitung beschrieben - sowohl den eNOS-Signalweg inhibitorisch beeinflusst als auch einen direkten zytotoxischen Effekt auf die Tubulusregion besitzt.

4.4. Rosiglitazon und iNOS

Ein Hinweis auf die schädliche Rolle der iNOS im Tiermodell des renalen Ischämie-Reperfusionsschadens ist, dass iNOS-Knockoutmäuse und Mäuse, die mit einem spezifischen iNOS-Blocker vorbehandelt werden, einen geringeren Nierenschaden aufweisen als unbehandelte Normaltiere (Chatterjee2003c).

Das durch iNOS gebildete NO bindet mit radikalen Sauerstoffmolekülen zu dem zytotoxischen Peroxynitrit (ONOO^-) (Goligorsky2002). Peroxynitrit übt seinen toxischen Effekt durch eine gesteigerte Inflammationsreaktion und eine Induktion der Zellapoptose aus (Schrierer 2004, Pacher2007).

Außerdem reduziert ONOO^- Tetrahydrobiopterin, einen essentieller Co-Faktor von eNOS (Foerstermann2006). Durch Entzug dieses Co-Faktors wird L-Arginin nicht mehr zu L-Citrullin und NO, sondern O_2 zu zytotoxischen freien Sauerstoffradikalen oxidiert.

Dieser Prozess wird als Entkopplung der eNOS bezeichnet (Kakoki2000, Abbildung 33).

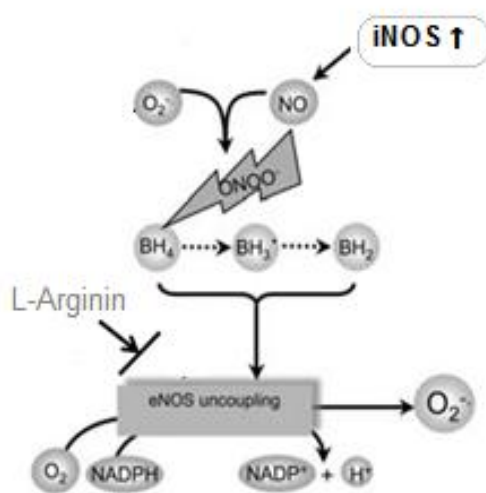


Abb. 33: Zusammenhang zwischen iNOS und der Entkopplung von eNOS. Die Mehrexpression von iNOS führt zu einer erhöhten Konzentration von Peroxynitrit (ONOO^-). Dies wiederum führt zu einer verstärkten Oxidation des Co-Faktors Tetrahydrobiopterin (BH_4), was eine verstärkte Entkopplung von eNOS bewirkt: Es wird kein L-Arginin gebunden, sondern O_2 zu zytotoxischen Sauerstoffradikalen (O_2^-) reduziert.

Modifiziert nach Foerstermann2006.

Eine hohe Expression von iNOS kann also über die vermehrte Produktion von NO und ONOO^- auf eine verstärkte Entkopplung von eNOS hinweisen. Hierdurch ist es möglich, dass trotz einer erhöhten eNOS-Expression weniger NO produziert wird.

Schließlich finden sich Hinweise in vitro (Wessells2006) und in vivo in Wildtyp-Ratten (Vaziri1999), dass eine gesteigerte NO-Produktion direkt die Expression der eNOS-mRNA in Endothelzellen senkt.

In der vorliegenden Arbeit kam es in der Clamp+NaCl Gruppe zu einem signifikanten Anstieg von iNOS-mRNA um den Faktor 3,9 im Vergleich zur Sham+NaCl Gruppe. In der Clamp+RGZ stieg die Expression von iNOS-mRNA im Vergleich zur Sham+RGZ Gruppe nur noch um den Faktor 2,5 an.

Der Anstieg von iNOS im Ischämie-Reperfusionsschaden der Niere im Tiermodell wird in vielen Arbeiten bestätigt: Die Expression der iNOS im ischämischen akuten Nierenversagen steigt auf mRNA Ebene auf das zweifache (Chen2008), die Proteinexpression ist nach 24 Stunden um das vierfache (Chen2008, Liu2007) bis sechsfache (Schneider2003) erhöht.

Zwar ist bei Liu und Chen (Chen2008, Liu2007) die Besserung des Ischämie-Reperfusionsschadens der Niere durch Präkonditionieren bzw. Ozon-Applikation mit einem weiteren Anstieg von iNOS assoziiert. Die meisten Arbeiten zeigen jedoch, dass eine Besserung des Ischämie-Reperfusionsschadens mit einem Abfall der iNOS-Expression verbunden ist: Bei Schneider et al. bewirkt die Gabe von L-Arginin in der renalen Ischämie einen Abfall der iNOS-Expression um über 50% und dabei eine Verdreifachung von Inulin- und PAH-Clearance (Schneider2003). Durch die Induktion von Hämoxxygenase-1 (HO-1) (Volti2007) wird ein Anstieg von Serum-Creatinin und des iNOS-Protein im Tiermodell des Nierenversagens fast vollständig verhindert, durch die Gabe von Melatonin (Rodriguez-Reynoso2004) erfolgt im Tiermodell der renalen Ischämie eine Reduktion von Serum-Creatinin und von iNOS.

Auffällig ist in diesen drei Arbeiten im Vergleich zu den vorliegenden Ergebnissen, dass durch die Intervention in der renalen Ischämie zwar ein ähnliches Niveau bei der Reduktion von iNOS, jedoch eine deutlich bessere Nierenfunktion erreicht wird. Dies könnte durch die zusätzlichen renoprotektiven Wirkmechanismen der Substanzen erklärt werden: Bei Melatonin über seine antioxidativen (Rodriguez-Reynoso2004), bei HO-1 über seinen antiapoptotischen Einfluss (Volti2007). Bei L-Arginin könnte der Einfluss auf das

ADMA/SDMA/DDAH System, das in den folgenden Kapiteln eingehend besprochen wird, eine Rolle spielen.

Die Applikation von Rosiglitazon mit seiner anti-inflammatorischen Wirkungskomponente ist in verschiedenen Tiermodellen mit einer Senkung der Expression von iNOS assoziiert:

Rosiglitazon führt in den Tiermodellen der Pankreatitis (Folch-Puy2006) oder Peridontitis (Paola2006) zu einer deutlichen Herabregulation der iNOS-Expression in Kombination mit einer Besserung der lokalen Entzündungsreaktion. Bei Shiojiri et al. (Shiojiri2002) wird im Tiermodell der Arthritis der Abfall von iNOS durch Rosiglitazon auf 50% im Vergleich zu unbehandelten Tieren quantifiziert, was in diesem Ausmaß den Ergebnissen dieser Arbeit entspricht.

Cuzzocrea et al. (Cuzzocrea2004a, Cuzzocrea2004) zeigen anhand einer spezifischen Blockade von PPAR γ , dass die Herabregulation der iNOS-Expression über PPAR γ vermittelt wird.

In den genannten Studien wurde ebenfalls die Nitrosylierung des Gewebes als Hinweis auf die Konzentration von Peroxynitrit gemessen. Die Nitrotyrosinfärbung als Zeichen der Entzündungsreaktion war in Gewebe von mit Rosiglitazon behandelten Tieren deutlich abgeschwächt im Vergleich zu unbehandelten Tieren. Im Tiermodell der Arthritis entspricht der Abfall der Peroxynitrit-Produktion durch Gabe von Rosiglitazon dem Abfall der iNOS Expression, nämlich 50% (Shiojiri2002).

Im Ischämie-Reperfusionsschaden des Herzens von Kaninchen mit induzierter Hypercholesterinämie bewirkt Rosiglitazon eine verbesserte Funktionsleistung, einhergehend mit einer Reduktion der iNOS- und Nitrotyrosin-Expression (Liu2007).

Im Tiermodell der renalen Ischämie bewirkt 15-deoxy-Delta(12,14)-prostaglandin J₂ als PPAR γ -Agonist immunohistochemisch eine Reduktion der verstärkten iNOS-Expression nach 48h (Chatterjee2004a). Dies war mit einer gebesserten renalen Funktion verbunden.

Zusammenfassend unterstützen die zitierten Arbeiten das Ergebnis, dass die Gabe von Rosiglitazon im akuten Nierenversagen eine reduzierte Expression von iNOS-mRNA und eine Besserung der renalen Funktion bewirkt.

Anhand der zitierten Studien ist die Annahme möglich, dass in der vorliegenden Arbeit in der Clamp+RGZ Gruppe entsprechend der Reduktion von iNOS-mRNA weniger Peroxynitrit gebildet wurde als in der Clamp+NaCl Gruppe.

Eine geringere Konzentration von Peroxynitrit reduziert den Gewebsschaden. Die Besserung der tubulären Funktion könnte hierauf zurückgeführt werden.

Diese Aussage wird gestützt durch die Tatsache, dass mit einem PPAR γ -Liganden behandelte Tiere im ischämischen akuten Nierenversagen neben einer Reduktion von iNOS-mRNA auch immunhistologisch ca. 50 % weniger Zellschäden aufweisen als unbehandelte Tiere (Chatterjee2004a)

Im nächsten Schritt war die Hypothese zu validieren, dass die geringere Expression der iNOS-mRNA über eine verminderte Bildung von Peroxynitrit zu einem verminderten Gewebsschaden führt. Hierfür wurden die durch Peroxynitrit verursachte Inflamationsreaktion und Zellapoptose untersucht.

4.5. Rosiglitazon und ED-1

Die inflammatorische Reaktion kann im Tiermodell durch verschiedene Parameter bestimmt werden: Etabliert ist die Messung der spezifischen Myeloperoxidase-Aktivität (Chatterjee2002, Rodriguez-Reynoso2004a), die zytologische Zählung gut differenzierbarer Subpopulationen der inflammatorischen Zellen wie der neutrophilen Granulozyten (Cuzzocrea2004a, Cuzzocrea2004, Paola2006) sowie die Darstellung von Markermolekülen der Macrophagen (Raff2005).

Eine Minderung der Infiltration von Entzündungszellen ist mit einer Besserung des Ischämie-Reperfusionsschadens der Niere und einer Minderung der Expression von iNOS assoziiert (Chatterjee2002, Rodriguez-Reynoso2004a).

Die Gabe Rosiglitazon reduziert die Infiltration von Entzündungszellen im Tiermodell der Periodontitis (Paola2006) und der Pleuritis (Cuzzocrea2004a) parallel zu einer deutlichen Verringerung der iNOS-Expression.

Die Vermutung, dass die Gabe von Rosiglitazon mit einer Minderung der iNOS-mRNA Expression auch die Infiltration von ED-1 positiven Macrophagen reduziert, wird in der vorliegenden Arbeit immunhistochemisch bestätigt.

Sivarajah et al. zeigen, dass die Applikation von Rosiglitazon im Tiermodell des ischämischen akuten Nierenversagen die Infiltration durch neutrophile Granulozyten reduziert (Sivarajah2003). Die iNOS-Expression wird von Sivarajah et al. in diesem Zusammenhang nicht bestimmt.

Die Minderung der iNOS-mRNA Expression ist also nicht nur mit einer renalen Funktionsverbesserung im ischämischen akuten Nierenversagen sondern auch mit einer deutlich nachweisbaren Verringerung der Inflammationsreaktion assoziiert. Es ist naheliegend, dass die verringerte Inflammation den renalen Zellschaden mindert (Raff2005).

4.6. Rosiglitazon und CC3

Zur weiteren Evaluation der Vermutung, dass die Expression von iNOS-mRNA mit dem Ausmaß des Zellschadens im akuten Nierenversagen korreliert, wurde mit der cleaved caspase 3 ein zentraler Marker der Apoptose untersucht. Die Cysteinprotease Caspase verursacht im hypoxischen Zellschaden eine Apoptoseinduktion. Bei renaler Ischämie wird die Caspase im proximalen Tubulus aktiviert und trägt über Proteolyse des Aktinzytoskeletts sowie Stimulierung inflammatorischer Zytokine (IL-18) zum tubulären Zelluntergang im renalen Ischämie-Reperfusionsschaden bei (Edelstein1999). Eine verstärkte Expression der CC3 im akuten Ischämie-Reperfusionsschaden der Niere konnte in früheren Arbeiten unserer Arbeitsgruppe nachgewiesen werden (Raff2005).

Die Gabe von Rosiglitazon reduziert in isolierten Pankreaszellen die Expression von Cleaved Caspase 3 (Abaraviciene2008). In vivo Studien am Rattenmodell des hypertensiven Schadens (Choi2007) und Ischämie-Reperfusionsschadens des Herzens (Liu2004) und der Niere (Doi2007) bestätigen einen antiapoptotischen Effekt von PPAR γ -Agonisten mittels Minderexpression von Apoptosemarkern wie CC3 in der Immunhistochemie.

Analog zu diesen Arbeiten konnte in der vorliegenden Arbeit durch die Gabe von Rosiglitazon im ANV eine Verringerung der Expression des Apoptose-Markers CC3 im Western-Blot gezeigt werden.

Der Caspase-Signalweg wird auch durch Peroxynitrit aktiviert, dessen Konzentration mit der Expression von iNOS korreliert (Pacher2007, Shiojiri2002). Die Herabregulation von iNOS könnte somit den Zusammenhang zwischen der Applikation des PPAR γ -Agonisten und Reduktion der Apoptoserate erklären. In der Literatur zeigt sich, dass eine verminderte Expression von iNOS mit einer verminderten Expression (Volti2007, Abaraviciene2008) oder Aktivität von CC3 korreliert (Liu2004).

Die Regulation von CC3 entspricht der Regulation von ED-1 im akuten Nierenversagen. Beides kann als Hinweis auf die Wirkung von iNOS im akuten Nierenversagen gelten: Durch einen verminderten Anstieg der iNOS-mRNA unter Rosiglitazon kommt es zu einer geringeren Bildung von Peroxynitrit. Dadurch werden Inflammations- und Apoptosereaktion vermindert und der Zellschaden verringert.

Wie in Kapitel 4.2. dargelegt, wird eine Steigerung der PAH-Nettosekretion im akuten ischämischen Nierenversagen auf eine verbesserte tubuläre Zellfunktion bzw. einen geringeren tubulären Gewebsschaden zurückgeführt.

Deshalb kann die Besserung der tubulären Komponente in Form der PAH-Nettosekretion unter Rosiglitazon im akuten ischämischen Nierenversagen durch die Regulation von iNOS erklärt werden.

Auffällig ist, dass die Expression der iNOS-mRNA in der Gruppe Clamp+RGZ im Vergleich zu den Shamtieren immer noch signifikant erhöht ist, während

ED-1 und CC3 komplett gehemmt werden.

Für diese Diskrepanz bieten sich drei Erklärungsmöglichkeiten:

1. ED-1 stellt nur einen Marker der Inflammationsreaktion dar. Durch Messung anderer Marker wie zum Beispiel der inflammatorischer Zytokine könnte man noch einen Restbestand an Inflammationsreaktion nachweisen.

Allerdings besteht in Arbeiten des ischämischen Nierenschadens im Rattenmodell kein relevanter Unterschied in der Regulation verschiedener Entzündungsmarker (Rodriguez-Reynoso2004a, Chatterjee2002). Außerdem stellt die Infiltration durch Entzündungszellen den entscheidenden Schädigungsmechanismus in der Inflammationsreaktion dar (Sivarajah2003).

2. Durch eine unvollständige Translation oder posttranslationale Modifikation des iNOS-Proteins könnte die effektive NO-Produktion geringer sein als von der Regulation der mRNA zu vermuten wäre.

Allerdings zeigen Chen et al., dass sich die Regulation von iNOS-mRNA im Ischämie-Reperfusionsschaden gut auf die Proteinebene übertragen lässt (Chen2008). Bezüglich einer posttranslationalen Modifikation finden sich in der Literatur keine Hinweise.

3. Schließlich könnte Rosiglitazon neben der Reduktion von iNOS über andere Mechanismen eine Minderung der Apoptose und Inflammationsreaktion bewirken. So wird in der Arbeit von Hwang et al. spekuliert, dass die Gabe von Rosiglitazon eine Steigerung des Radikalfängers Superoxiddismutase (SOD) bzw. eine Minderung des Radikalenbildners NADPH oxidase bewirkt (Hwang2005, Abbildung 32). Die Folge wäre eine Minderung des gewebstoxischen und inflammationsverstärkenden oxidativen Stresses.

Im Hinblick auf die geringe Besserung der Nierenfunktion scheint Inflammations- und der Apoptosereaktion im vorliegenden Ischämie-Reperfusionsschaden nur eine untergeordnete Rolle zu spielen.

Neben seiner direkten Wirkung auf Inflammation und Apoptose kann iNOS die Regulation von eNOS beeinflussen (Kapitel 1.2. und Kapitel 3.4.).

Insgesamt stehen drei Erklärungsmöglichkeiten für die Regulation der eNOS-mRNA durch Rosiglitazon zur Verfügung.

1. Rosiglitazon bewirkt über die Aktivierung der PPAR γ -Rezeptoren eine vermehrte Transkription von eNOS. In der Literatur zeigen sich wie in Kapitel 4.3. bereits dargelegt sehr unterschiedliche Ergebnisse bezüglich dieser Hypothese.
2. Das Enzym iNOS reguliert eNOS über den inhibitorischen Einfluss von NO: Die Gruppe um Wessells et al. zeigt in vitro, dass eine Überexpression von iNOS ohne begleitende Entzündungsreaktion die Expression von eNOS direkt reduziert (Wessells2006). Vaziri et al. konnten in vivo an Ratten nachweisen, dass die exogene Applikation von NO zu einer Minderexpression von eNOS in aortalen Endothelzellen um 50% führt (Vaziri1999). In der vorliegenden Arbeit bewirkt die Gabe von Rosiglitazon im akuten Nierenversagen eine Herabregulation der iNOS-mRNA mit einer Minderproduktion von NO. Dadurch könnte die Heraufregulation der eNOS-mRNA durch Rosiglitazon erklärt werden.
3. Die Inflammationsreaktion übt einen inhibitorischen Einfluss auf eNOS aus: Die Induktion einer Inflammationsreaktion im Gastrointestinaltrakt von Ratten führt zu einer Reduktion von eNOS im betroffenen Gewebe (Zhou1997, Chen1997). Als Ursache vermutet man proinflammatorische Zytokine, die eine Herabregulation der Expression von eNOS bewirken (Valerio2006).

Da sich für alle drei Möglichkeiten der eNOS-Regulation durch Rosiglitazon Hinweise in der Literatur finden, kann eine multifaktorielle Ursache im akuten Nierenversagen nicht ausgeschlossen werden.

Die induzierbare NO-Synthase beeinflusst nicht nur die Expression von eNOS sondern auch deren Aktivität (Kapitel 1.2. und 3.4.).

Es ist bekannt, dass eine Überproduktion von NO eine endotheliale Dysfunktion im Ischämie-Reperfusionsschaden bewirkt (Guan2006). Diese Überproduktion kann aus einer gesteigerten Expression von iNOS resultieren (Ichihara2000). Bezüglich der Wirkung von NO wurde gezeigt, dass NO in vitro (Grider2008) und in vivo im Tiermodell des akuten ischämischen Nierenversagens zu einer Einschränkung der Aktivität von eNOS um bis zu 50% führt (Noiri1996, Schwartz1997).

Aus diesem Grund steigert die Gabe von Rosiglitazon mittels einer Suppression der iNOS-Expression im akuten Nierenversagen nicht nur die Expression von eNOS sondern auch dessen Aktivität. Beides sollte zu einer deutlich vermehrten Produktion von nephroprotektivem NO führen. Trotzdem bleibt die renale Funktion um über 80 % eingeschränkt. Anscheinend existieren Faktoren, die die Mehrproduktion von NO verhindern oder der protektiven Wirkung von NO entgegenwirken.

4.7. Rosiglitazon und der ADMA-Metabolismus

Im nächsten Schritt wurde die Regulation des potenten endogenen Inhibitors von eNOS, des L-Argininderivats ADMA, untersucht.

ADMA wirkt sowohl durch Entkopplung von eNOS als auch durch deren kompetitive Inhibierung, wodurch eine erhöhte Serumkonzentration an ADMA eine verminderte NO Produktion trotz erhöhter eNOS Expression bedingen könnte.

Die Konzentration von ADMA wird durch das vermehrte Auftreten von radikalen Sauerstoffmolekülen (ROS) gesteigert (Abbildung 34). Diese ROS sind im Ischämie-Reperfusionsschaden des akuten Nierenversagens deutlich erhöht (Chatterjee2004b, Chatterjee2002).

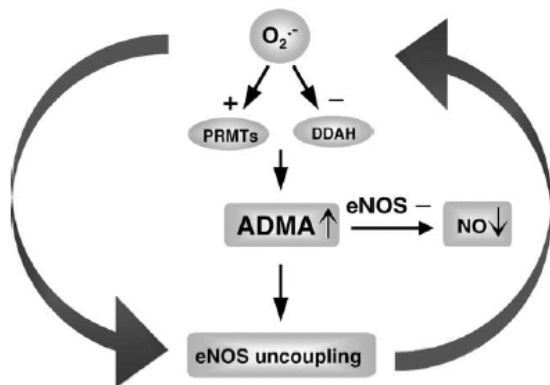


Abb. 34: circulus vitiosus zwischen ADMA und eNOS Entkopplung modifiziert nach Sydow 2003

In der vorliegenden Arbeit konnte erstmals eine um ca. 20 % erhöhte ADMA-Serumkonzentration 24 Stunden nach ischämischen akuten Nierenversagen nachgewiesen werden. Die Gabe von Rosiglitazon zeigte keinen Effekt.

Der Anstieg von ADMA im chronischen Nierenversagen ist im Tiermodell (Matsuguma2006, Matsumoto2007) und in Studien am Menschen (Vallance2004, Bode-Boeger2007) nachgewiesen. Im Rattenmodell des akuten Nierenversagens zeigte Volti et al., dass der Plasma-ADMA Spiegel innerhalb der ersten Stunde der Reperfusion im Vergleich zu den Kontrolltieren um 80% ansteigt. In der dritten Stunde sinkt der ADMA-Serumspiegel auf das Niveau der Kontrolltiere (Volti2008).

Rosiglitazon scheint keinen Einfluss auf die Serumkonzentration von ADMA auszuüben. Auch in der Arbeit von Wang et al. übt die Gabe von Rosiglitazon im Tiermodell des Diabetes mellitus keinen Einfluss auf den erhöhten ADMA-Serumspiegel aus (Wang2007).

Zusammenfassend ist der ADMA-Serumspiegel im akuten Nierenversagen signifikant erhöht. Rosiglitazon übt keinen direkten Einfluss auf den ADMA-Serumspiegel aus.

An dieser Stelle waren zwei Fragestellungen von Interesse: 1. Wie kann der Anstieg von ADMA erklärt werden. 2. Welche Wirkung hat dieser Anstieg auf den NO-Stoffwechsel.

zu 1.:

Die Einschränkung der Nierenfunktion ist für den Anstieg von ADMA eine unzureichende Erklärung, da auch bei deutlich eingeschränkter Nierenfunktion die Clearance für ADMA erhalten bleibt (Matsuguma2006). Außerdem zeigten Carello et al. im Tiermodell, dass der ADMA-Serumspiegel selbst nach beidseitiger Nephrektomie nicht wesentlich ansteigt (Carello2006).

Deshalb wurde die Regulation der am ADMA-Metabolismus beteiligten Enzyme im akuten ischämischen Nierenversagen untersucht.

In der vorliegenden Arbeit war die Expression von DDAH II im akuten ischämischen Nierenversagen nicht reguliert. Die Expression von DDAH I war unabhängig von der Applikation von Rosiglitazon im akuten Nierenversagen um ca. 30% reduziert.

Diese Ergebnisse stimmen sehr gut mit den Daten von Li Volti et al. überein: Im Modell des ischämischen akuten Nierenversagens ist eine Stunde nach der Intervention DDAH II ebenfalls nicht reguliert, wohingegen DDAH I signifikant um 25 % herabreguliert ist (Volti2008).

Im Tiermodell der bilateralen 5/6 Nephrektomie zeigt sich nach 24h eine noch deutlichere Herabregulation der Dimethylarginin-Diaminohydrolase I (DDAH I) um ca. 50%. Zusätzlich kommt es in diesem Modell auch zu einer Herabregulation von DDAH II um ca. 80% (Matsuguma2006).

Interessanterweise entspricht in der vorliegenden Arbeit das Ausmaß der Herabregulation von DDAH I exakt dem Serumanstieg von ADMA. Die Herabregulation von DDAH I um 20% könnte den Serumanstieg von ADMA um 20% bedingen. Unterstützt wird diese Hypothese durch die Arbeiten von Matsuguma und Matsumoto et al.: Im Tiermodell des chronischen Nierenversagens kann ein erhöhter ADMA-Serumspiegel durch eine gezielte Überexpression von DDAH signifikant gesenkt werden (Matsuguma2006, Matsumoto2007).

Bei Matsuguma et al. wird neben der Herabregulation von DDAH auch ein Anstieg der Protein-Methylarginin-Transferase 1 (PRMT 1) als Ursache für den Anstieg des Serum-ADMA bei einer bilateralen 5/6-Nephrektomie identifiziert.

Im vorliegenden Tiermodell des ischämischen akuten Nierenversagens war PRMT 1 im Vergleich zur Sham-Gruppe nicht reguliert. Dies spricht gegen einen Einfluss von PRMT 1 auf den ADMA-Serumspiegel in der vorliegenden Arbeit.

Die Gabe von Rosiglitazon zeigte unabhängig von der Nierenfunktion sowohl in der Sham als auch in der Clamp Gruppe eine signifikante Herabregulation im Vergleich zur entsprechenden NaCl-Gruppe. In einer in vitro Studie von Onanai et al. wird ebenfalls die Expression von PRMT 1 durch die Gabe eines PPAR γ -Agonisten gesenkt. Dies geschieht indirekt mittels der inhibitorischen Wirkung des PPAR γ -Agonisten auf den transkriptionellen Regulator nuclear factor- κ B (Osanai2003).

In der Literatur finden sich für das Tiermodell keine Untersuchungen bezüglich der Gabe von PPAR γ -Agonisten und der Regulation von PRMT. Deshalb wird in dieser Arbeit erstmals die in vitro Studie von Osanai et al. mit einem in vivo Modell bestätigt.

Zusammenfassend scheinen weder PRMT 1 noch DDAH 2 einen Effekt auf die Regulation des ADMA-Serumspiegels im akuten Nierenversagen zu besitzen. Die Minderexpression von renalem DDAH 1 im akuten Nierenversagen um ca. 30 % hingegen stellt eine sehr gute Erklärungsmöglichkeit für den Serumanstieg von ADMA um 20 % dar.

Zu 2.:

Die nächste Frage ist, welche Wirkung der Anstieg von ADMA auf den NO-Stoffwechsel ausübt.

ADMA wirkt auf den NO-Stoffwechsel durch seine Funktion als kompetitiver Inhibitor der NOS. Um die Wirkung von ADMA zu bewerten genügt nicht die isolierte Analyse von ADMA. Auch die Konzentration des eigentlichen

Substrates von NOS, der Aminosäure L-Arginin, muss bei einem kompetitiven Inhibitionsprozess berücksichtigt werden. Bode-Böger et al. zeigen in einer Meta-Analyse verschiedener Krankheitsbilder mit erhöhter ADMA-Serumkonzentration, dass das Verhältnis zwischen Substrat und Inhibitor, L-Arginin und ADMA, den entscheidenden Einfluss auf die Aktivität von NOS, in diesem Fall besonders eNOS, besitzt. Der Quotient aus L-Arginin und ADMA ist für die Pathogenität von ADMA entscheidend (Bode-Boeger2007). Matsumoto et al. zeigen, dass im Tiermodell des chronischen Nierenversagens eine erhöhte Konzentration von ADMA mit einem erniedrigten L-Arginin-Serumspiegel einhergeht (Matsumoto2007). Ein deutlich erniedrigter L-Arginin-Serumspiegel und ein erhöhter L-Arginin / ADMA Quotient findet sich auch Patienten mit chronischem Nierenversagen (Bode-Boeger2007).

In der vorliegenden Arbeit steigt der Serumspiegel von L-Arginin im ischämischen akuten Nierenversagen unabhängig von der Rosiglitazon-Applikation um über 60 % an. Da sich der Serumspiegel von ADMA nur um 20 % erhöht, steigt der Quotient aus L-Arginin und ADMA im akuten Nierenversagen an.

Diese Ergebnisse legen nahe, dass ADMA im ischämischen akuten Nierenversagen keine Pathogenität für den NO-Stoffwechsel besitzt, da der Anstieg des Inhibitors ADMA durch den Anstieg des Substrates L-Arginin überkompensiert wird (Abbildung 35).

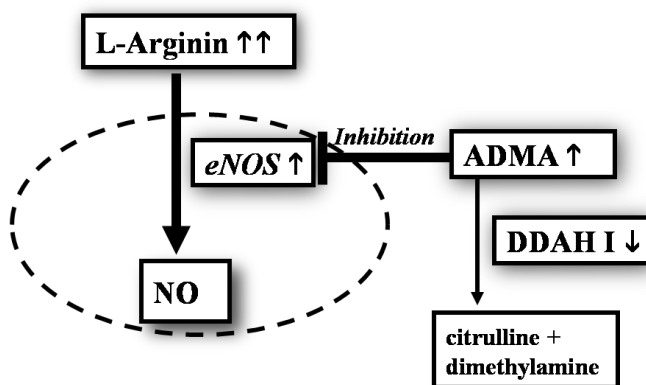


Abb. 35: ADMA / L-Arginin / DDAH im akuten Nierenversagen.

Der Anstieg von ADMA lässt sich durch einen Abfall von DDAH I erklären. Die kompetitiv inhibierende Wirkung von ADMA auf eNOS wird durch die Verdopplung der Serumkonzentration von L-Arginin kompensiert.

Wie in der Einleitung beschrieben, genügt bereits ein sehr geringer Anstieg von ADMA, um eine deutliche Blockade von eNOS zu bewirken. Diese hohe Affinität von ADMA zu eNOS drückt sich in der niedrigen Inhibitionskonstante $K_i = 0,9 \mu\text{M}$ aus. Aus diesem Grund war die nächste Frage, ob der Anstieg des Serum-L-Arginins wirklich ausreichend war, um den Anstieg von ADMA zu kompensieren.

Für jedes einzelne Tier wurde der Quotient aus den Serumspiegeln von L-Arginin und ADMA gebildet. Es zeigte sich ein signifikanter Anstieg des Quotienten in den Clamp-Gruppen im Vergleich zu den Gruppen Kontrolle und Sham+NaCl. Zwischen Sham+RGZ und Clamp+RGZ bestand kein signifikanter Unterschied. Dies bedeutet, dass Rosiglitazon einen Anstieg des Quotienten im akuten Nierenversagen zu verhindern scheint.

Ein Anstieg des Quotienten bedeutet, dass eNOS mehr L-Arginin zur Verfügung steht oder die Blockade durch weniger ADMA reduziert ist. Beides führt zu einer vermehrten Produktion von NO. Folglich würde im akuten Nierenversagen die Gruppe Clamp+NaCl eine höhere eNOS-Aktivität und damit eine vermehrte Produktion von NO aufweisen als die Gruppe Clamp+RGZ.

Diese Steigerung der Aktivität könnte die geringere Expression von eNOS in der Clamp+NaCl Gruppe im Vergleich zur Clamp+RGZ Gruppe ausgleichen. Damit wäre die Diskrepanz zwischen deutlicher eNOS-Heraufregulation und nur geringem Clearance-Anstieg im akuten Nierenversagen durch Gabe von Rosiglitazon erklärt: Es würde im Vergleich zu unbehandelten Tieren der steigernde Effekt des heraufregulierten L-Arginin/ADMA Quotienten in der Gruppe Clamp+RGZ fehlen.

Allerdings scheint diese Erklärungsmöglichkeit aus mehreren Gründen unwahrscheinlich:

Zum einen besteht bezüglich des Quotienten kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen Clamp+NaCl und Clamp+RGZ. Somit sollte der Effekt des Quotienten in beiden Gruppen gleich sein. Auf der anderen Seite besteht bezüglich der Expression von eNOS-mRNA ein signifikanter Unterschied

zwischen den Clamp-Gruppen. Somit sollte der Effekt hier deutlich unterschiedlich sein.

Der Quotient der Clamp+NaCl Gruppe ist höher als der Quotient der Sham bzw. Kontrollgruppe. Es ist fraglich, ob ein Anstieg des Quotienten über das Niveau von Kontroll/Normaltieren überhaupt einen Effekt besitzt. Die meisten Studien zeigen, dass bei Normaltieren eine Erhöhung des Quotienten aus L-Arginin und ADMA über das physiologische Niveau hinaus keinen Effekt auf die Produktion von NO bewirkt (Bode-Boeger2007). Deshalb scheint auch bei Tieren im akuten Nierenversagen ein Effekt durch den Anstieg des Quotienten auf die Produktion von NO eher unwahrscheinlich.

Schließlich unterscheiden sich die Quotienten aller Gruppen in ihrer Auswirkung auf die Produktion von NO nur unwesentlich voneinander: Berechnet man die NO-Produktion der jeweiligen Quotienten entsprechend der Formel von (Tsikas2000), so liegen alle Werte in einem Bereich von 8 % (103 %-111 %) zu einem Referenzwert (100 %). Zwischen den Gruppen Clamp+NaCl und Clamp+RGZ bestand ein Unterschied von 4% bezüglich der NO-Produktion. Es scheint sehr unwahrscheinlich, dass diese vier Prozent einen relevanten Unterschied darstellen.

Somit scheint der fehlende Anstieg des L-Arginin/ADMA Quotienten im akuten Nierenversagen unter Rosiglitazon keine Auswirkungen auf den NO-Signalstoffwechsel zu besitzen.

Die aufgezeigten Überlegungen beziehen sich in erster Linie auf die endotheliale NO-Synthase. Die induzierbare NO-Synthase wird aus zwei Gründen von Veränderungen des extrazellulären L-Arginin/ADMA Quotienten deutlich weniger beeinflusst als eNOS:

1. Die Inhibitionskonstante von ADMA für iNOS liegt im Vergleich zu eNOS deutlich höher, somit wirkt ADMA primär auf eNOS (Palm2007). Trotzdem könnte auch im akuten Nierenversagen ein hemmender Effekt des erhöhten ADMA auf iNOS vorliegen (Wells2007), der einen noch stärkeren Anstieg von ED-1 und CC3 verhindert. Unterstützt wird diese Hypothese durch die

Tatsache, dass der durch Rosiglitazon reduzierte Anstieg von iNOS auf 170 % im Vergleich zur Sham-Gruppe keinen Effekt auf ED-1 und CC3 zu besitzen scheint. Somit könnte der inhibitorische Effekt von ADMA auf iNOS bis zu 70 % betragen.

2. Im Gegensatz zu eNOS unterliegt iNOS keiner intrazellulären Kompartimentierung (McDonald1997). Dem Enzym iNOS steht somit der komplette intrazelluläre L-Arginin Pool zur Verfügung. Die intrazelluläre Konzentration von L-Arginin ist immer höher als die Michaelis-Menten-Konstante für iNOS (Leiper1999). Aus diesem Grund ist iNOS von extrazellulären Konzentrationsänderungen von L-Arginin unabhängig.

Ein weiterer zu diskutierender Aspekt ist, ob sich das Verhältnis der Serumkonzentrationen von L-Arginin und ADMA auch intrazellulär widerspiegelt.

In der Arbeit von Kohli et al. sind im Rattenmodell des Diabetes die intrazellulären Konzentrationen von ADMA und L-Arginin um das vier- bis sechsfache erhöht im Vergleich zum extrazellulären Serumspiegel (Kohli2004). Eine Änderung des Serumspiegels von ADMA zeigt intrazellulär proportional die gleiche Änderung. Das gleiche gilt für den Spiegel von L-Arginin. Folglich entspricht der intrazelluläre Quotient aus L-Arginin und ADMA dem extrazellulären. Überträgt man diese Tatsache auf die vorliegende Arbeit, so müsste der Quotient aus L-Arginin/ADMA im akuten Nierenversagen intrazellulär ansteigen.

In der Arbeit von Cardounel et al. wird in vitro gezeigt, dass ein intrazellulärer Anstieg des L-Arginin/ADMA Quotienten mit einem Anstieg der NO-Produktion assoziiert ist (Cardounel2007). Folglich weist auch der erhöhte L-Arginin/ADMA Quotient in der vorliegenden Arbeit auf eine vermehrte intrazelluläre Produktion von NO hin.

Zusammenfassend scheint der deutliche Anstieg von [L-Arginin] sowohl extrazellulär als auch intrazellulär ausreichend, um den Anstieg von ADMA im akuten Nierenversagen zu kompensieren.

Folglich musste im nächsten Schritt untersucht werden, ob ein Faktor den intrazellulären Anstieg von L-Arginin trotz extrazellulärem Anstieg verhindern könnte

.

4.8. Rosiglitazon und SDMA

Symmetrisches Dimethylarginin (SDMA) ist ein Isomer zu ADMA, das einen indirekten Einfluss auf den L-Arginin/NO-Metabolismus ausübt: SDMA blockiert kompetitiv den transzellulären L-Arginin-Transporter y^+ -CAT (Kapitel 1.4.). SDMA wird fast vollständig renal ausgeschieden. Ein deutlicher Anstieg der SDMA-Serumkonzentration im chronischen Nierenversagen beim Menschen (Kielstein2006) aber auch im Tiermodell ist belegt (Matsuguma2006, Matsumoto2007). Es finden sich in der Literatur wenige Hinweise auf die Regulation von SDMA im akuten Nierenversagen: Bei intensivpflichtigen Patienten im akuten und chronischen Nierenversagen korreliert das erhöhte Serum-Kreatinin direkt positiv mit SDMA (Nijveldt2003a). Im Tiermodell der Sepsis ist ein Serum-Kreatininanstieg mit einem Anstieg des SDMA-Serumspiegels assoziiert (Nijveldt2003). Schließlich zeigen Ratten 24 Stunden nach einer beidseitigen Nephrektomie einen signifikanten SDMA-Anstieg von 0,2 μ M auf fast 3 μ M (Carello2006).

Mit dieser Arbeit wird erstmals gezeigt, dass SDMA im Tiermodell des ischämischen akuten Nierenversagens im Vergleich zu den entsprechenden Shamtieren um fast 400% ansteigt. Die Gabe von Rosiglitazon hatte keinen Einfluss auf SDMA. Dies stimmt mit der Studie von Richir et al. überein, die keinen Einfluss von Rosiglitazon auf den SDMA-Spiegel bei intensivpflichtigen Patienten mit verschiedenen Krankheitsbildern nachweisen kann (Richir2009). In der Literatur untersucht einzig die Arbeit von Bode-Böger et al. den Zusammenhang zwischen SDMA und NO-Stoffwechsel: In vitro vermindert eine

erhöhte SDMA-Konzentration die Produktion von NO durch eine Blockade des transzellulären L-Arginin-Transportes signifikant (Bode-Boeger2006).

Das akute Nierenversagen bewirkt eine Akkumulation von SDMA unabhängig von Rosiglitazon.

Aufgrund dieser Ergebnisse kann die fehlende funktionelle Verbesserung der Nierenfunktion unter der Gabe von Rosiglitazon trotz deutlich gesteigerter Expression von eNOS erklärt werden: Der im Nierenversagen erhöhte SDMA-Spiegel blockiert den transzellulären L-Arginin-Transport, was zu einem Serumanstieg von L-Arginin führt. Intrazellulär kommt es dadurch zu einem Mangel an L-Arginin für die endotheliale NO-Synthase. Die durch Rosiglitazon bewirkte Steigerung der Expression von NOS bleibt daher ohne Auswirkung auf die Nierenfunktion (Abbildung 36).

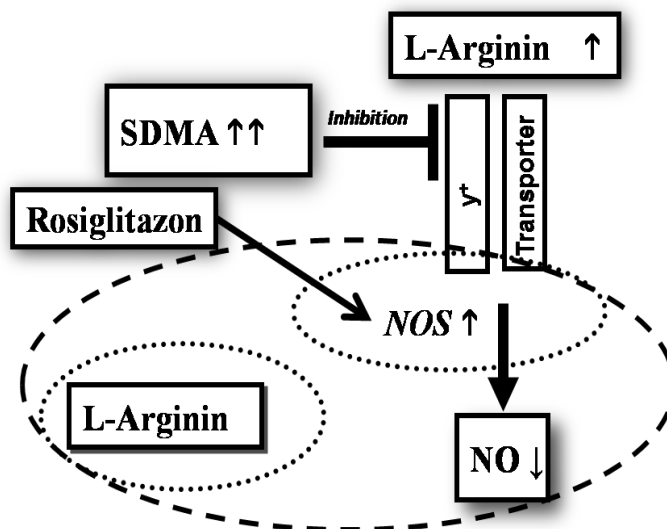


Abb. 36: SDMA und Rosiglitazon im akuten Nierenversagen. Der Anstieg von SDMA blockiert den transzellulären γ^+ -Transporter. Dies führt zu einem Anstieg von Serum-L-Arginin und – aufgrund der Kompartimentierung zu einem intrazellulären Mangel an L-Arginin mit einer verminderten Produktion von NO - unabhängig von NOS-Expression, die durch Rosiglitazon gesteigert wird.

Der Anstieg von SDMA im ANV stellt nicht nur eine Erklärung für die eingeschränkte Wirkung von Rosiglitazon dar. Dieser Anstieg bietet zudem eine neue Hypothese zur Erklärung des L-Arginin-Paradoxes im ischämischen akuten Nierenversagen an.

4.9. Das L-Arginin-Paradox

Die exogene Gabe von L-Arginin bewirkt in vielen Krankheitsbildern eine funktionelle Verbesserung (Bode-Boeger2007). Wie in der Einleitung beschrieben, sinkt die intrazelluläre Konzentration von L-Arginin selten unter 200µM (Leiper1999). Dies ist deutlich höher als die Michaelis-Menten-Konstante (K_m) von eNOS für L-Arginin. Die Tatsache, dass die Applikation von L-Arginin trotzdem eine erhöhte Produktion von NO bewirkt, wird als L-Arginin-Paradox bezeichnet (Kapitel 1.5.). Böger et al. erklärt dieses Paradox mit einem erniedrigtem L-Arginin / ADMA Quotienten, der - wie in den Kapitel 1.5. und 4.7. dargelegt – zu einer Blockade von eNOS führt (Boeger2004). Der Anstieg des Quotienten mittels der Gabe von L-Arginin löst die Blockade auf. Unterstützt wird die Hypothese durch die Tatsache, dass sich in fast allen Krankheitsbildern, in denen sich das L-Arginin-Paradox zeigte, ein meist deutlich erniedrigter L-Arginin/ADMA Quotient vorlag.

In dieser Arbeitsgruppe konnte bereits nachgewiesen werden, dass die Gabe von L-Arginin auch im ischämischen akuten Nierenversagen sowohl im Tiermodell (Schramm1994, Schneider2003) als auch bei Patienten mit Transplantatnieren (Schramm1994) eine funktionelle Verbesserung bewirkt.

Nun schien es naheliegend, das L-Arginin-Paradox im ischämischen akuten Nierenversagen ebenfalls mit einem erniedrigten L-Arginin / ADMA Quotienten zu erklären. Die vorliegenden Ergebnisse widerlegen diese Vermutung. Der Quotient steigt im Nierenversagen an und bietet keine Erklärung für das Paradox.

SDMA hingegen wäre eine neue, hinreichende Erklärung für das L-Arginin-Paradox im akuten Nierenversagen: Das akute Nierenversagen bewirkt eine Akkumulation von SDMA. Dieses blockiert den transzellulären L-Arginin-Transport, was zu einem Serumanstieg von L-Arginin führt. Intrazellulär kommt zu einem relativen Mangel an L-Arginin in der Umgebung der L-Arginin-Transporter. Wie im vorangegangenen Kapitel dargelegt ist iNOS von extrazellulären Konzentrationsänderungen von L-Arginin unabhängig. Aus

diesem Grund dürfte der inhibitorische Effekt von SDMA auf iNOS minimal sein. Von der Blockade des transzellulären L-Arginin-Transports ist die endotheliale NO-Synthase in besonderem Maße betroffen, da sie durch ihre intrazelluläre Kompartimentierung und Co-Lokalisation zu den γ^+ -Transportern von dem extrazellulären L-Arginin abhängig ist (McDonald1997, Abbildung 34).

Die exogene Gabe von L-Arginin kann die kompetitive Blockade des Transporters durch SDMA aufheben. Hierdurch steht der endothelialen NO-Synthase mehr Substrat zur Verfügung, es kommt zu einem Anstieg der NO-Produktion.

4.10. Ausblick

Die Frage, ob die beobachteten Veränderungen des L-Arginin/DDAH-Komplexes aus dem ischämischen Nierenversagen resultieren oder ob sie kausal zu dessen Verlauf beitragen, wird Gegenstand weiterer Untersuchungen sein. Eine Möglichkeit dieses zu erreichen, wäre der Vergleich zwischen Wildtyp- und DDAH-Knockout-Mäusen. Die Beteiligung von DDAH am Pathomechanismus der pulmonalen Hypertonie wurde mittels DDAH-Knockout-Mäusen gezeigt (Wojciak-Stothard2009).

Ein weiterer Ansatz ist die Kombination von Rosiglitazon mit Medikamenten, die auf eine andere Art als Rosiglitazon auf den NO-Stoffwechsel einwirken. Atorvastatin zum Beispiel steigert die Produktion von NO durch Beeinflussung des Phosphorylierungsstatus von eNOS (Ye2006). Im ischämischen Myokardgewebe von Ratten konnte gezeigt werden, dass Pioglitazon und Atorvastatin einen additiv protektiven Effekt besitzen (Ye2006).

Auch könnte die Kombination von L-Arginin und Rosiglitazon im akuten Nierenversagen deutliche Funktionsverbesserung ermöglichen, da die Gabe von L-Arginin die SDMA-Blockade überwindet.

Beim Menschen liegen aktuell keine Daten bezüglich der Regulation von SDMA im akuten Nierenversagen vor. Eine erhöhte Serumkonzentration ist beim Menschen mit chronischer Niereninsuffizienz beschrieben (Kielstein2006). Hier gilt SDMA auch als kombinierter Prognosefaktor für die Nierenfunktion (Bode-

Boeger2006) und den Schweregrad einer koronaren Herzerkrankung. Letzteres könnte darauf hinweisen, dass erhöhtes SDMA im Serum eine systemische Wirkung besitzt: Durch erhöhtes SDMA könnte die Aufnahme von L-Arginin in Zellen anderer Organsysteme, wie zum Beispiel der Endothelzellen der Coronararterien, blockiert werden.

Mittels einer observationellen Studie an Patienten im akuten Nierenversagen könnten die Konzentrationen von SDMA im Verlauf analysiert werden. Durch Kombination dieser Daten mit dem Patienten-Outcome bzgl. Morbidität und Mortalität könnte man ermitteln, welcher Konzentrationsanstieg von SDMA eine klinische Relevanz besitzt.

Da SDMA dialysabel ist, könnte langfristig ein neuer Marker für die Initiierung des Nierenersatzverfahrens zur Vermeidung systemischer Komplikationen beschrieben werden.

5. Zusammenfassung

Diese Arbeit befasst sich mit dem NO-Stoffwechsel und der Wirkung von Rosiglitazon (RGZ) im ischämischen akuten Nierenversagen (iANV).

Im Rattenmodell wurde mittels 60-minütigem Clamping beider Aa. renales ein iANV induziert. Die Unterteilung erfolgte in die Gruppen mit Gefäßclamping jeweils ohne bzw. mit Gabe von RGZ (Clamp+NaCl bzw. Clamp+RGZ) sowie in die entsprechenden Gruppen mit Scheinoperation (Sham+NaCl bzw. Sham+RGZ). Die Messungen der Clearance wurden photometrisch durchgeführt. Die Expression der Enzyme, Proteine und Metabolite des NO-Stoffwechsels wurde mittels Western-Blot, real time-PCR aus Nierenhomogenisaten oder Flüssigchromatographie mit Massenspektrometrie-Kopplung (LC-MS/MS) aus Serumproben quantitativ bestimmt. Der postinterventionelle Versuchszeitraum erstreckte sich über 24 Stunden.

In der unbehandelten Clamp-Gruppe zeigte sich ein deutlicher Abfall (90%) der Inulin- und PAH-Clearance und PAH-Nettosekretion. Die Gabe von RGZ besserte die Inulin- und PAH-Clearance sowie die PAH-Nettosekretion.

Die Applikation von RGZ im iANV bewirkte keine aktivitätssteigernde Phosphorylierung der endothelialen NO-Synthase (eNOS) an Serine 1177. An eNOS Serine 633 nahm durch RGZ die Phosphorylierung ab. Auch das, an vielen Signalkaskaden beteiligte, Akt zeigte keine vermehrte Aktivierung. Die Gesamtexpression der eNOS-mRNA wurde durch RGZ im iANV signifikant geringer (auf 60% des Ausgangswertes) vermindert als in unbehandelten Tieren (20% des Ausgangswertes). Dies stellte einen Kontrast zur funktionellen Verbesserung dar, die durch RGZ nur auf 30 % des Ausgangswertes anstieg.

Im iANV stieg die Expression der induzierbaren NO-Synthase (iNOS) - mRNA um das vierfache an. Die Gabe von RGZ halbierte diesen Anstieg. Dieser verminderte Anstieg von iNOS kann als Erklärung für den Anstieg von eNOS dienen. Der Anstieg von ED-1 als Marker der Inflammationsreaktion sowie der Anstieg der Cleaved caspase 3 als Marker der Apoptosereaktion im iANV konnte nach der Applikation von RGZ nicht mehr nachgewiesen werden.

Insgesamt schienen Inflammationsreaktion und Apoptose keinen signifikanten Einfluss auf die funktionellen Parameter im iANV zu besitzen.

Das L-Argininderivat „Asymmetrisches Dimethylarginin“ (ADMA), das eNOS kompetitiv hemmt, stieg im iANV in der Clamp+NaCl und in der Clamp+RGZ Gruppe um ungefähr 20% an. Das an der Synthese von ADMA beteiligte Enzym PRMT 1 (Proteinargininmethyltransferase) und das ADMA-abbauende Enzym DDAH II (Dimethylarginindiaminohydrolase) wurden im iANV nicht reguliert. DDAH I, ein funktionsgleiches Isomer von DDAH II, zeigte im iANV eine Herabregulation um 20%. Diese Herabregulation könnte den Anstieg von Serum-ADMA im iANV erklären. Die Applikation von RGZ hatte weder auf ADMA noch auf DDAH einen regulatorischen Effekt. Die Halbierung der Expression von PRMT 1 durch RGZ hatte keinen Einfluss auf den ADMA-Serumspiegel.

L-Arginin (L-Arg) stieg mit 60% im iANV deutlich stärker an als ADMA und könnte den Anstieg von ADMA kompensieren. Der Anstieg von L-Arg war von RGZ unabhängig. Der Quotient aus L-Arg und ADMA stieg in unbehandelten Tieren im iANV signifikant an, unter der Gabe von RGZ jedoch nicht. Dieser fehlende Anstieg wirkte sich nicht wesentlich auf die Produktion von NO aus. Folglich stellen sowohl ADMA als auch der L-Arg/ADMA Quotient keine Erklärung für die unzureichende funktionelle Wirkung einer Expressionssteigerung von eNOS unter RGZ im iANV dar.

„Symmetrisches Dimethylarginin“ (SDMA) inhibiert als Isomer von ADMA die Aufnahme von L-Arg in die Zelle kompetitiv. SDMA zeigte im iANV einen Anstieg um fast 400 % im Vergleich zu den Shamtieren. SDMA wurde durch die Gabe von RGZ nicht reguliert. Hieraus wurde die Hypothese abgeleitet, dass der erhöhte SDMA-Spiegel den transzellulären L-Arg-Transport blockiert. Dies kann den Serumanstieg von L-Arg im iANV erklären und würde zu einem intrazellulären Mangel an L-Arg führen. Die durch RGZ bewirkte Steigerung der Expression von eNOS bliebe ineffektiv, da durch den Substratmangel die Produktion von NO nicht adäquat ansteigen könnte.

Das L-Arg-Paradox im iANV beschreibt die Tatsache, dass die Applikation von L-Arg im iANV zu einer Mehrproduktion von NO durch eNOS führt, obwohl der

Serumspiegel von L-Arg bereits vor Applikation klar über dem Sättigungsbereich von eNOS liegt. Da der Anstieg von ADMA im iANV durch den deutlich höheren Anstieg von L-Arg überkompensiert wird, scheint ADMA als Erklärung des Paradoxes nicht hinreichend. Der deutliche Anstieg von SDMA im iANV hingegen könnte über eine Blockade des L-Arg-Transporters zu einem intrazellulären Mangel an L-Arg führen. Diese kompetitive Blockade könnte durch die Applikation von L-Arg aufgehoben werden. Somit wäre SDMA eine Erklärung für das L-Arg Paradox.

Zusammenfassend wurde in dieser Arbeit gezeigt, dass der starke Anstieg von SDMA möglicherweise dem protektiven Effekt von RGZ im iANV entgegenwirkt. Außerdem konnte mit dem Anstieg von SDMA ein neuer Erklärungsansatz des L-Arg-Paradoxes im iANV aufgezeigt werden.

5. Summary

The protective effect of PPAR-gamma agonists in renal I/R-injury has already been shown. Here the influence of the PPAR-gamma agonist Rosiglitazone (RGZ) on the NO-pathway which plays an important role in the pathogenesis of and recovery from renal ischemia/reperfusion (I/R)-injury is investigated.

Asymmetric and symmetric dimethylarginine (ADMA/SDMA) are structurally similar to L-arginine (L-Arg). ADMA is released from PRMT1 (Proteinargininmethyltransferase) and competitively inhibits eNOS activity. SDMA impairs cellular L-Arg transport. Both, SDMA and ADMA are eliminated by renal excretion while ADMA is additionally metabolized by DDAH 1 / 2 (Dimethylargininindiaminohydrolase).

CD rats, subjected to bilateral I/R injury (60min) were administered RGZ. Sham served as control. 24 hours after reperfusion clearances were determined photometrically. The kidneys were removed. Measurements in the homogenisate of the renal cortex were made by qPCR, Western-Blot and immunohistochemistry. Serum was analyzed by LC-MS/MS.

I/R-injury caused a significant decrease in inulin-/PAH-clearance (5%/3% vs. sham). RGZ resulted in an improvement of renal function (12% vs. sham). RGZ

did not induce a phosphorylation of eNOS at Serine 1179. RGZ reduced phosphorylation of eNOS at Serine 633 (50% vs. sham). The phosphorylation of akt, which is involved in multiple signalling pathways, remained unchanged. RGZ significantly attenuated the decrease of eNOS-mRNA in I/R-injury (from 20% to 60% vs. sham). It remains unsolved why distinct effect of RGZ on eNOS evoked only an unexpected small functional amelioration after renal I/R-injury.

I/R-injury enhanced the expression of iNOS-mRNA. Moreover CC3 and ED-1 were significantly increased. RGZ attenuated the increase of iNOS expression significantly (from 400% to 170% vs. sham). The enhanced expression of CC3 and ED1 was almost completely reversed by RGZ.

Serum-levels of ADMA (+19%), SDMA (+145%) and L-Arg (+97%) were significantly elevated in clamping group compared to sham. RGZ had no effect on ADMA, SDMA and L-Arg levels. The L-Arg/ADMA ratio increased (+83%) in I/R-injury. This effect was abolished by RGZ. PRMT1 remained unchanged in the clamping group. However, the application of RGZ caused a significant down-regulation of PRMT1

(-50%) in sham and clamping group without an influence on ADMA level. Expression of DDAH 2 remained unchanged, DDAH 1 expression showed a down-regulation in the clamping-group. This down-regulation could explain the rise of ADMA serum-levels. RGZ had no effect on DDAH 1/2 regulations.

Both, the clear increase of L-Arg and the small rise in ADMA levels suggest that ADMA has no major role in the inhibition of eNOS activity. However, the distinct rise of SDMA after I/R-injury which is not influenced by RGZ could cause an intracellular lack of the NO-substrate L-Arg. Thus, one hypothesizes that despite increased eNOS expression by RGZ the NO-production remains heavily impaired due to the intracellular lack of L-Arg which results from the SDMA-dependent regulation. This additionally might explain the only small effect of RGZ on renal function after I/R-injury.

The L-Arginin-paradox describes the improvement of renal function during I/R-injury by adding L-Arg although the endothelial NO-synthase's (eNOS) K_M for the L-Arg substrate is already sufficient. SDMA could cause the rise of L-Arg serum-level and the intracellular lack of the substrate by blocking the L-Arg-

transporters. This blockade could be overcome by the additional application of L-Arg. So the changes in serum SDMA level might moreover be a new explanation of the L-Arg-paradox.

6. Literaturverzeichnis

Abaraviciene2008

Abaraviciene, S.M., Lundquist, I. & Salehi, A.
Rosiglitazone counteracts palmitate-induced beta-cell dysfunction by suppression of MAP kinase, inducible nitric oxide synthase and caspase 3 activities.
Cell Mol Life Sci, Department of Clinical Science, Division of Endocrine Pharmacology, UMAS, CRC, 205 02, Malmö, Sweden., **2008**, Vol. 65(14), pp. 2256-2265

Abdelrahman2005

Abdelrahman, M., Sivarajah, A. & Thiemermann, C.
Beneficial effects of PPAR-gamma ligands in ischemia-reperfusion injury, inflammation and shock.
Cardiovasc Res, Centre for Experimental Medicine, Nephrology and Critical Care, William Harvey Research Institute, St. Bartholomew's and The Royal London School of Medicine and Dentistry, Charterhouse Square, London, EC1M 6BQ, UK., **2005**, Vol. 65(4), pp. 772-781

Ali2007

Ali, T., Khan, I., Simpson, W., Prescott, G., Townend, J., Smith, W. & Macleod, A.
Incidence and outcomes in acute kidney injury: a comprehensive population-based study.
J Am Soc Nephrol, Departments of Medicine and Therapeutics, University of Aberdeen, Aberdeen, United Kingdom. tariq.ali@nhs.net, **2007**, Vol. 18(4), pp. 1292-1298

Bachmann1994

Bachmann, S. & Mundel, P.
Nitric oxide in the kidney: synthesis, localization, and function.
Am J Kidney Dis, Department of Anatomy and Cell Biology I, University of Heidelberg, Germany., **1994**, Vol. 24(1), pp. 112-129

Bagi2004

Bagi, Z., Koller, A. & Kaley, G.
PPARgamma activation, by reducing oxidative stress, increases NO bioavailability in coronary arterioles of mice with Type 2 diabetes.
Am J Physiol Heart Circ Physiol, Department of Physiology, New York Medical College, Valhalla, New York 10595, USA., **2004**, Vol. 286(2), pp. H742-H748

Bellomo2004b

Bellomo, R., Ronco, C., Kellum, J.A., Mehta, R.L., Palevsky, P. & workgroup, A.D.Q.I.
Acute renal failure - definition, outcome measures, animal models, fluid therapy and information technology needs: the Second International Consensus Conference of the Acute Dialysis Quality Initiative (ADQI) Group.
Crit Care, Department of Intensive Care and Medicine, Austin Health, Melbourne, Australia. rinaldo.bellomo@austin.org.au, **2004**, Vol. 8(4), pp. R204-R212

Berry2005

Berry, E.B.E., Keelan, J.A., Helliwell, R.J.A., Gilmour, R.S. & Mitchell, M.D.
Nanomolar and micromolar effects of 15-deoxy-delta 12,14-prostaglandin J2 on amnion-derived WISH epithelial cells: differential roles of peroxisome proliferator-activated receptors gamma and delta and nuclear factor kappa B.
Mol Pharmacol, Health Sciences, Auckland, New Zealand., **2005**, Vol. 68(1), pp. 169-178

Bode-Boeger2006

Bode-Böger, S.M., Scalera, F., Kielstein, J.T., Martens-Lobenhoffer, J., Breithardt, G., Fobker, M. & Reinecke, H.
Symmetrical dimethylarginine: a new combined parameter for renal function and extent of coronary artery disease.
J Am Soc Nephrol, Institute of Clinical Pharmacology, University Hospital, Otto von Guericke University, Leipziger Strasse 44, D-39120 Magdeburg, Germany.
stefanie.bode-boeger@medizin.uni-magdeburg.de, **2006**, Vol. 17(4), pp. 1128-1134

Bode-Boeger2007

Bode-Böger, S.M., Scalera, F. & Ignarro, L.J.
The L-arginine paradox: Importance of the L-arginine/asymmetrical dimethylarginine ratio.
Pharmacol Ther, Institute of Clinical Pharmacology, University Hospital, Otto-von-Guericke University, Leipziger Strasse 44, 39120 Magdeburg, Germany. stefanie.bode-boeger@medizin.uni-magdeburg.de, **2007**, Vol. 114(3), pp. 295-306

Boeger2000

Böger, R.H., Sydow, K., Borlak, J., Thum, T., Lenzen, H., Schubert, B., Tsikas, D. & Bode-Böger, S.M.
LDL cholesterol upregulates synthesis of asymmetrical dimethylarginine in human endothelial cells: involvement of S-adenosylmethionine-dependent methyltransferases.
Circ Res, Institute of Clinical Pharmacology, Hannover Medical School, Germany.
boeger.rainer@mh-hannover.de, **2000**, Vol. 87(2), pp. 99-105

Boeger2004

Böger, R.H.
Asymmetric dimethylarginine, an endogenous inhibitor of nitric oxide synthase, explains the "L-arginine paradox" and acts as a novel cardiovascular risk factor.
J Nutr, Experimental Medicine, University Hospital, Hamburg-Eppendorf, Germany.
boeger@uke.uni-hamburg.de, **2004**, Vol. 134(10 Suppl), pp. 2842S-2847S; discussion 2853S

Bonventre2003

Bonventre, J.V. & Weinberg, J.M.
Recent advances in the pathophysiology of ischemic acute renal failure.
J Am Soc Nephrol, Renal Division, Brigham and Women's Hospital, and Department of Medicine, Harvard Medical School, and the Harvard--MIT, Division of Health Sciences and Technology, Charlestown, Massachusetts, USA.
joseph_bonventre@hms.harvard.edu, **2003**, Vol. 14(8), pp. 2199-2210

Boo2002

Boo, Y.C., Sorescu, G., Boyd, N., Shiojima, I., Walsh, K., Du, J. & Jo, H.
Shear stress stimulates phosphorylation of endothelial nitric-oxide synthase at Ser1179 by Akt-independent mechanisms: role of protein kinase A.
J Biol Chem, GA Inst Technol, Atlanta, **2002**, Vol. 277(5), pp. 3388-3396

Boyle2008

Boyle, J.G., Logan, P.J., Ewart, M.-A., Reihill, J.A., Ritchie, S.A., Connell, J.M.C., Cleland, S.J. & Salt, I.P.
Rosiglitazone stimulates nitric oxide synthesis in human aortic endothelial cells via AMP-activated protein kinase.
J Biol Chem, The Henry Wellcome Laboratory for Cell Biology, Division of Biochemistry and Molecular Biology, Institute of Biomedical and Life Sciences, University of Glasgow, Glasgow, UK., **2008**, Vol. 283(17), pp. 11210-11217

Burgermeister2007

Burgermeister, E. & Seger, R.
MAPK kinases as nucleo-cytoplasmic shuttles for PPARgamma.
Cell Cycle, Department of Medicine II, Klinikum rechts der Isar, Technical University,
Munich, Germany., **2007**, Vol. 6(13), pp. 1539-1548

Calnek2003

Calnek, D.S., Mazzella, L., Roser, S., Roman, J. & Hart, C.M.
Peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligands increase release of nitric oxide from endothelial cells.
Arterioscler Thromb Vasc Biol, Department of Medicine, Veterans Affairs and Emory University, Medical Centers, Decatur, Ga 30033, USA. dcalnek@hotmail.com, **2003**, Vol. 23(1), pp. 52-57

Camp2000

Camp, H.S., Li, O., Wise, S.C., Hong, Y.H., Frankowski, C.L., Shen, X., Vanbogelen, R. & Leff, T.
Differential activation of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma by troglitazone and rosiglitazone.
Diabetes, Department of Cell Biology, Warner-Lambert Company, Ann Arbor, Michigan, USA., **2000**, Vol. 49(4), pp. 539-547

Cardounel2007

Cardounel, A.J., Cui, H., Samouilov, A., Johnson, W., Kearns, P., Tsai, A.-L., Berka, V. & Zweier, J.L.
Evidence for the pathophysiological role of endogenous methylarginines in regulation of endothelial NO production and vascular function.
J Biol Chem, Department of Pharmacology, Davis Heart and Lung Research Institute, The Ohio State University College of Medicine, Columbus, Ohio 43210, USA. cardounel-1@medctr.osu.edu, **2007**, Vol. 282(2), pp. 879-887

Carello2006

Carello, K.A., Whitesall, S.E., Lloyd, M.C., Billecke, S.S. & D'Alecy, L.G.
Asymmetrical dimethylarginine plasma clearance persists after acute total nephrectomy in rats.
Am J Physiol Heart Circ Physiol, Dept. of Molecular and Integrative Physiology, Univ. of Michigan Medical School, Ann Arbor, MI 48109-0622, USA., **2006**, Vol. 290(1), pp. H209-H216

Chatterjee2002

Chatterjee, P.K., Zacharowski, K., Cuzzocrea, S., Brown, P.A.J., Stewart, K.N., Mota-Filipe, H. & Thiemermann, C.
Lipoteichoic acid from Staphylococcus aureus reduces renal ischemia/reperfusion injury.
Kidney Int, Nephrology, William Harvey Research Institute, Queen Mary, University of London, Charterhouse Square, London EC1M 6BQ, England, United Kingdom. p.k.chatterjee@qmul.ac.uk, **2002**, Vol. 62(4), pp. 1249-1263

Chatterjee2003b

Chatterjee, P.K., Patel, N.S.A., Kvale, E.O., Brown, P.A.J., Stewart, K.N., Britti, D., Cuzzocrea, S., Mota-Filipe, H. & Thiemermann, C.
The tyrosine kinase inhibitor tyrphostin AG126 reduces renal ischemia/reperfusion injury in the rat.
Kidney Int, Critical Care, William Harvey Research Institute, Queen Mary - University of London, London, United Kingdom., **2003**, Vol. 64(5), pp. 1605-1619

Chatterjee2003c

Chatterjee, P.K., Kvale, E.O., Patel, N.S.A. & Thiernemann, C.
GW274150 inhibits nitric oxide production by primary cultures of rat proximal tubular cells.
Med Sci Monit, Critical Care, William Harvey Research Institute, Queen Mary-University of London, UK., **2003**, Vol. 9(10), pp. BR357-BR362

Chatterjee2004a

Chatterjee, P.K., Patel, N.S.A., Cuzzocrea, S., Brown, P.A.J., Stewart, K.N., Mota-Filipe, H., Britti, D., Eberhardt, W., Pfeilschifter, J. & Thiernemann, C.
The cyclopentenone prostaglandin 15-deoxy-Delta(12,14)-prostaglandin J2 ameliorates ischemic acute renal failure.
Cardiovasc Res, Department of Experimental Medicine, Nephrology and Critical Care, William Harvey Research Institute, Queen Mary-University of London, Charterhouse Square, London EC1M 6BQ, UK., **2004**, Vol. 61(3), pp. 630-643

Chatterjee2004b

Chatterjee, P.K., Patel, N.S.A., Kvale, E.O., Brown, P.A.J., Stewart, K.N., Mota-Filipe, H., Sharpe, M.A., Paola, R.D., Cuzzocrea, S. & Thiernemann, C.
EUK-134 reduces renal dysfunction and injury caused by oxidative and nitrosative stress of the kidney.
Am J Nephrol, Department of Experimental Medicine, Nephrology and Critical Care, William Harvey Research Institute, Queen Mary University of London, London, UK., **2004**, Vol. 24(2), pp. 165-177

Chen2008

Chen, H., Xing, B., Liu, X., Zhan, B., Zhou, J., Zhu, H. & Chen, Z.
Ozone oxidative preconditioning protects the rat kidney from reperfusion injury: the role of nitric oxide.
J Surg Res, Department of Urology, Renmin Hospital of Wuhan University, Wuhan University, Wuhan, China., **2008**, Vol. 149(2), pp. 287-295

Chen1997

Chen, K., Inoue, M., Wasa, M., Fukuzawa, M., Kamata, S. & Okada, A.
Expression of endothelial constitutive nitric oxide synthase mRNA in gastrointestinal mucosa and its downregulation by endotoxin.
Life Sci, Department of Pediatric Surgery, Osaka University Medical School, Suita, Japan. kchen@pedsurg.med.osaka-u.ac.jp, **1997**, Vol. 61(13), pp. 1323-1329

Chintala1993

Chintala, M.S., Chiu, P.J., Vemulapalli, S., Watkins, R.W. & Sybertz, E.J.
Inhibition of endothelial derived relaxing factor (EDRF) aggravates ischemic acute renal failure in anesthetized rats.
Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol, Schering-Plough Research Institute, Kenilworth, NJ 07033-0539., **1993**, Vol. 348(3), pp. 305-310

Cho2004

Cho, D.-H., Choi, Y.J., Jo, S.A. & Jo, I.
Nitric oxide production and regulation of endothelial nitric-oxide synthase phosphorylation by prolonged treatment with troglitazone: evidence for involvement of peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) gamma-dependent and PPARgamma-independent signaling pathways.
J Biol Chem, Department of Biomedical Sciences, National Institute of Health, 5 Nokbun-dong, Eunpyung-gu, Seoul 122-701, Korea., **2004**, Vol. 279(4), pp. 2499-2506

Choi2007

Choi, B.S., Yang, H.J., Ahn, K.O., Lim, S.W., Kim, S.H., Kim, J.Y., Li, C., Kim, Y.S., Kim, J., Bang, B.K. & Yang, C.W.
Renoprotective effects of rosiglitazone in stroke-prone spontaneously hypertensive rats.
Kidney Blood Press Res, Cell Death Research Center, Division of Nephrology,
Kangnam St. Mary's Hospital, Catholic University of Korea, Seoul, Korea., **2007**, Vol.
30(4), pp. 212-223

Closs1997

Closs, E.I., Basha, F.Z., Habermeier, A. & Förstermann, U.
*Interference of L-arginine analogues with L-arginine transport mediated by the y+
carrier hCAT-2B.*
Nitric Oxide, Department of Pharmacology, Johannes Gutenberg University, Mainz,
Germany. closs@mzdmza.zdv.uni-mainz.de, **1997**, Vol. 1(1), pp. 65-73

Collino2005

Collino, M., Patel, N.S.A., Lawrence, K.M., Collin, M., Latchman, D.S., Yaqoob, M.M. &
Thiemermann, C.
*The selective PPARgamma antagonist GW9662 reverses the protection of LPS in a
model of renal ischemia-reperfusion.*
Kidney Int, Centre for Experimental Medicine, Nephrology and Critical Care, William
Harvey Research Institute, St. Bartholomew's and The Royal London School of
Medicine and Dentistry, Queen Mary-University of London, London, UK., **2005**, Vol.
68(2), pp. 529-536

Cooke2004

Cooke, J.P.
Asymmetrical dimethylarginine: the Uber marker?
Circulation, Division of Cardiovascular Medicine, Stanford University School of
Medicine, 300 Pasteur Dr, Stanford, Calif 94305, USA. john.cooke@stanford.edu, **2004**,
Vol. 109(15), pp. 1813-1818

Corrigan1999

Corrigan, G., Ramaswamy, D., Kwon, O., Sommer, F.G., Alfrey, E.J., Dafoe, D.C.,
Olshen, R.A., Scandling, J.D. & Myers, B.D.
*PAH extraction and estimation of plasma flow in human postischemic acute renal
failure.*
Am J Physiol, Department of Medicine, Division of Nephrology, Department of Health
Research and Policy, Stanford University School of Medicine, Stanford, California
94305, USA., **1999**, Vol. 277(2 Pt 2), pp. F312-F318

Cruz2007

Cruz, D.N., Bolgan, I., Perazella, M.A., Bonello, M., de Cal, M., Corradi, V., Polanco, N.,
Ocampo, C., Nalesso, F., Piccinni, P., Ronco, C. & on Acute Kidney Injury (NEIPHROS-
AKI) Investigators, N.E.I.P.H.R.O.S.
*North East Italian Prospective Hospital Renal Outcome Survey on Acute Kidney Injury
(NEIPHROS-AKI): targeting the problem with the RIFLE Criteria.*
Clin J Am Soc Nephrol, Department of Nephrology and Intensive Care, San Bortolo
Hospital, Vicenza, Italy., **2007**, Vol. 2(3), pp. 418-425

Cuzzocrea2003

Cuzzocrea, S., Pisano, B., Dugo, L., Ianaro, A., Patel, N.S.A., Paola, R.D., Genovese, T., Chatterjee, P.K., Rosa, M.D., Caputi, A.P. & Thiemermann, C.

Rosiglitazone and 15-deoxy-Delta12,14-prostaglandin J2, ligands of the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma (PPAR-gamma), reduce ischaemia/reperfusion injury of the gut.

Br J Pharmacol, Department of Clinical and Experimental Medicine and Pharmacology, Torre Biologica, Policlinico Universitario, 98123 Messina, Italy., **2003**, Vol. 140(2), pp. 366-376

Cuzzocrea2004

Cuzzocrea, S., Pisano, B., Dugo, L., Ianaro, A., Patel, N.S.A., Paola, R.D., Genovese, T., Chatterjee, P.K., Fulia, F., Cuzzocrea, E., Rosa, M.D., Caputi, A.P. & Thiemermann, C.

Rosiglitazone, a ligand of the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma, reduces the development of nonseptic shock induced by zymosan in mice.

Crit Care Med, Department of Clinical and Experimental Medicine and Pharmacology, Policlinico Universitario, Messina, Italy., **2004**, Vol. 32(2), pp. 457-466

Cuzzocrea2004a

Cuzzocrea, S., Pisano, B., Dugo, L., Ianaro, A., Maffia, P., Patel, N.S.A., Paola, R.D., Ialenti, A., Genovese, T., Chatterjee, P.K., Rosa, M.D., Caputi, A.P. & Thiemermann, C.

Rosiglitazone, a ligand of the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma, reduces acute inflammation.

Eur J Pharmacol, Department of Clinical and Experimental Medicine and Pharmacology, School of Medicine, University of Messina, Torre Biologica, Policlinico Universitario Via C. Valeria, Gazzi, 98100 Messina, Italy. salvator@unime.it, **2004**, Vol. 483(1), pp. 79-93

Dobrian2004

Dobrian, A.D., Schriver, S.D., Khraibi, A.A. & Prewitt, R.L.

Pioglitazone prevents hypertension and reduces oxidative stress in diet-induced obesity.

Hypertension, Department of Physiological Sciences, Eastern Virginia Medical School, 700W Olney Rd, Norfolk, Va 23507, USA. dobriaad@evms.edu, **2004**, Vol. 43(1), pp. 48-56

Doi2007

Doi, S., Masaki, T., Arakawa, T., Takahashi, S., Kawai, T., Nakashima, A., Naito, T., Kohno, N. & Yorioka, N.

Protective effects of peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligand on apoptosis and hepatocyte growth factor induction in renal ischemia-reperfusion injury.

Transplantation, Department of Molecular and Internal Medicine, Graduate School of Biomedical Sciences, Hiroshima University, Hiroshima, Japan., **2007**, Vol. 84(2), pp. 207-213

Edelstein1999

Edelstein, C.L., Shi, Y. & Schrier, R.W.

Role of caspases in hypoxia-induced necrosis of rat renal proximal tubules.

J Am Soc Nephrol, Department of Medicine, University of Colorado School of Medicine, Denver 80262, USA. Charles.edelstein@uchsc.edu, **1999**, Vol. 10(9), pp. 1940-1949

Fenske2005

Fenske, W.

Funktioneller Einfluss der pleiotropen Effekte des HMG-CoA-Reduktase Hemmers Atorvastatin auf die Nierenfunktionen im ischämisch akuten Nierenversagen

Dissertation, **2005**

Fischer2008

Fischer, D.
Funktionelle Effekte auf das CO- und NO-System im ischämischen akuten Nierenversagen unter dem Einfluss von Zinn-Mesoporphyrin
Dissertation, **2008**

Foerstermann2006

Förstermann, U.
Janus-faced role of endothelial NO synthase in vascular disease: uncoupling of oxygen reduction from NO synthesis and its pharmacological reversal.
Biol Chem, Department of Pharmacology, Johannes Gutenberg University, D-55101 Mainz, Germany. ulrich.foerstermann@uni-mainz.de, **2006**, Vol. 387(12), pp. 1521-1533

Foglieni2006

Foglieni, C., Fulgenzi, A., Ticozzi, P., Pellegatta, F., Sciorati, C., Belloni, D., Ferrero, E. & Ferrero, M.E.
Protective effect of EDTA preadministration on renal ischemia.
BMC Nephrol, Cardiovascular Department, Istituto Scientifico San Raffaele, via Olgettina, 60 Milan, Italy. foglieni.chiara@hsr.it, **2006**, Vol. 7, pp. 5

Folch-Puy2006

Folch-Puy, E., Granell, S., Iovanna, J.L., Barthet, M. & Closa, D.
Peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonist reduces the severity of post-ERCP pancreatitis in rats.
World J Gastroenterol, Department of Experimental Pathology, IIBB-CSIC, IDIBAPS, Barcelona, Spain., **2006**, Vol. 12(40), pp. 6458-6463

Freund2005

Freund, R.
Der Einfluss von L-Arginin auf den NO-Stoffwechsel im akuten ischämischen Nierenversagen
Dissertation, **2005**

Fujisawa2008a

Fujisawa, T., Nakajima, A., Fujisawa, N., Takahashi, H., Ikeda, I., Tomimoto, A., Yonemitsu, K., Nakajima, N., Kudo, C., Wada, K., Kubota, N., Terauchi, Y., Kadowaki, T., Nakagama, H. & Blumberg, R.S.
Peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) suppresses colonic epithelial cell turnover and colon carcinogenesis through inhibition of the beta-catenin/T cell factor (TCF) pathway.
J Pharmacol Sci, Division of Gastroenterology, Yokohama City University School of Medicine, Kanazawa-ku, Yokohama, Japan., **2008**, Vol. 106(4), pp. 627-638

Goligorsky2002

Goligorsky, M.S., Brodsky, S.V. & Noiri, E.
Nitric oxide in acute renal failure: NOS versus NOS.
Kidney Int, Department of Medicine, State University of New York, Stony Brook, NY 11794-8152, USA. mgoligorsky@mail.som.sunysb.edu, **2002**, Vol. 61(3), pp. 855-861

Goligorsky2004

Goligorsky, M.S., Brodsky, S.V. & Noiri, E.
NO bioavailability, endothelial dysfunction, and acute renal failure: new insights into pathophysiology.
Semin Nephrol, Department of Medicine, New York Medical College, Valhalla 10595, USA. michael_goligorsky@nymc.edu, **2004**, Vol. 24(4), pp. 316-323

Gonon2007

Gonon, A.T., Bulhak, A., Labruto, F., Sjöquist, P.-O. & Pernow, J.
Cardioprotection mediated by rosiglitazone, a peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligand, in relation to nitric oxide.
Basic Res Cardiol, Dept. of Cardiology, Karolinska University Hospital, Solna, 17176, Stockholm, Sweden. adrian.gonon@medks.ki.se, **2007**, Vol. 102(1), pp. 80-89

Grider2008

Grider, J.R. & Murthy, K.S.
Autoinhibition of endothelial nitric oxide synthase (eNOS) in gut smooth muscle by nitric oxide.
Regul Pept, Department of Physiology and Biophysics, School of Medicine, Box 980551, Virginia Commonwealth University, Richmond, VA 23298, United States. jgrider@vcu.edu, **2008**, Vol. 151(1-3), pp. 75-79

Guan2006

Guan, Z., Gobé, G., Willgoss, D. & Endre, Z.H.
Renal endothelial dysfunction and impaired autoregulation after ischemia-reperfusion injury result from excess nitric oxide.
Am J Physiol Renal Physiol, Renal Research Centre, University of Queensland, Queensland, Australia., **2006**, Vol. 291(3), pp. F619-F628

Harris2004

Harris, M.B., Blackstone, M.A., Sood, S.G., Li, C., Goolsby, J.M., Venema, V.J., Kemp, B.E. & Venema, R.C.
Acute activation and phosphorylation of endothelial nitric oxide synthase by HMG-CoA reductase inhibitors.
Am J Physiol Heart Circ Physiol, Department of Pediatrics, Medical College of Georgia, Augusta, Georgia 30912-2500, USA. mbharr@wm.edu, **2004**, Vol. 287(2), pp. H560-H566

Heemskerk2009

Heemskerk, S., Masereeuw, R., Russel, F.G.M. & Pickkers, P.
Selective iNOS inhibition for the treatment of sepsis-induced acute kidney injury.
Nat Rev Nephrol, Department of Intensive Care Medicine and the Department of Pharmacology and Toxicology, Radboud University Nijmegen Medical Center, Nijmegen, The Netherlands. s.heemskerk@ic.umcn.nl, **2009**, Vol. 5(11), pp. 629-640

Hoste2007

Hoste, E.A.J. & Corte, W.D.
Epidemiology of AKI in the ICU.
Acta Clin Belg Suppl, Intensive Care Unit, University Hospital Ghent, Belgium. eric.hoste@ugent.be, **2007**(2), pp. 314-317

Huang2008

Huang, P.-H., Sata, M., Nishimatsu, H., Sumi, M., Hirata, Y. & Nagai, R.
Pioglitazone ameliorates endothelial dysfunction and restores ischemia-induced angiogenesis in diabetic mice.
Biomed Pharmacother, Department of Cardiovascular Medicine, University of Tokyo, Graduate School of Medicine, 7-3-1 Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8655, Japan., **2008**, Vol. 62(1), pp. 46-52

Hwang2005

Hwang, J., Kleinhenz, D.J., Lassègue, B., Griendling, K.K., Dikalov, S. & Hart, C.M.
Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma ligands regulate endothelial membrane superoxide production.

Am J Physiol Cell Physiol, Division of Pulmonary and Critical Care Medicine, Pulmonary Section, Atlanta Veterans Affairs and Emory University Medical Centers (151-P) 1670 Clairmont Road, Decatur, GA 30033, USA., **2005**, Vol. 288(4), pp. C899-C905

Ichihara2000

Ichihara, A., Hayashi, M., Navar, L.G. & Saruta, T.

Inducible nitric oxide synthase attenuates endothelium-dependent renal microvascular vasodilation.

J Am Soc Nephrol, Department of Internal Medicine, Keio University School of Medicine, 35 Shinanomachi, Tokyo, Japan., **2000**, Vol. 11(10), pp. 1807-1812

Iglesias2006

Iglesias, P. & Díez, J.J.

Peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonists in renal disease.

Eur J Endocrinol, Department of Endocrinology, Hospital General, Segovia, Spain. piglesias@hgse.sacyl.es, **2006**, Vol. 154(5), pp. 613-621

Iglesias2006b

Iglesias, P. & Díez, J.J.

Peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonists in renal disease.

Eur J Endocrinol, Hospital General, Segovia, Spain. piglesias@hgse.sacyl.es, **2006**, Vol. 154(5), pp. 613-621

Jo2006

Jo, S.-K., Sung, S.-A., Cho, W.-Y., Go, K.-J. & Kim, H.-K.

Macrophages contribute to the initiation of ischaemic acute renal failure in rats.

Nephrol Dial Transplant, Division of Nephrology, Department of Internal Medicine, Korea University Hospital, Anam-Dong, Sungbuk-Ku, Seoul 136-705, Korea., **2006**, Vol. 21(5), pp. 1231-1239

Kakimoto1970

Kakimoto, Y. & Akazawa, S.

Isolation and identification of N-G,N-G- and N-G,N'-G-dimethyl-arginine, N-epsilon-mono-, di-, and trimethyllysine, and glucosylgalactosyl- and galactosyl-delta-hydroxylysine from human urine.

J Biol Chem, **1970**, Vol. 245(21), pp. 5751-5758

Kakoki2000

Kakoki, M., Hirata, Y., Hayakawa, H., Suzuki, E., Nagata, D., Tojo, A., Nishimatsu, H., Nakanishi, N., Hattori, Y., Kikuchi, K., Nagano, T. & Omata, M.

Effects of tetrahydrobiopterin on endothelial dysfunction in rats with ischemic acute renal failure.

J Am Soc Nephrol, The Second Department of Internal Medicine, Faculty of Medicine, The University of Tokyo, Japan., **2000**, Vol. 11(2), pp. 301-309

Kaundal2009

Kaundal, R.K., Iyer, S., Kumar, A. & Sharma, S.S.

Protective effects of pioglitazone against global cerebral ischemic-reperfusion injury in gerbils.

J Pharmacol Sci, Molecular Neuropharmacology Laboratory, Department of Pharmacology and Toxicology, National Institute of Pharmaceutical Education and Research (NIPER), India., **2009**, Vol. 109(3), pp. 361-367

Khan2005

Khan, O., Riazi, S., Hu, X., Song, J., Wade, J.B. & Ecelbarger, C.A.
Regulation of the renal thiazide-sensitive Na-Cl cotransporter, blood pressure, and natriuresis in obese Zucker rats treated with rosiglitazone.
Am J Physiol Renal Physiol, Department of Medicine, Georgetown University, Washington, DC 20057-1412, USA., **2005**, Vol. 289(2), pp. F442-F450

Kielstein2009

Kielstein, J.T., Fliser, D. & Veldink, H.
Asymmetric dimethylarginine and symmetric dimethylarginine: axis of evil or useful alliance?
Semin Dial, Department of Internal Medicine, Division of Nephrology and Hypertension, Medical School Hannover, Hannover, Germany., **2009**, Vol. 22(4), pp. 346-350

Kielstein2006

Kielstein, J.T., Salpeter, S.R., Bode-Boeger, S.M., Cooke, J.P. & Fliser, D.
Symmetric dimethylarginine (SDMA) as endogenous marker of renal function--a meta-analysis.
Nephrol Dial Transplant, Division of Cardiovascular Medicine, Stanford University School of Medicine, 300 Pasteur Drive, Stanford, CA 94305-5406, USA. Kielstein@yahoo.com., **2006**, Vol. 21(9), pp. 2446-2451

Kielstein2008

Kielstein, J.T. & Zoccali, C.
Asymmetric dimethylarginine: a novel marker of risk and a potential target for therapy in chronic kidney disease.
Curr Opin Nephrol Hypertens, Division of Nephrology, Department of Internal Medicine, Medical School Hannover, Germany. Kielstein@yahoo.com, **2008**, Vol. 17(6), pp. 609-615

Kohli2004

Kohli, R., Meininger, C.J., Haynes, T.E., Yan, W., Self, J.T. & Wu, G.
Dietary L-arginine supplementation enhances endothelial nitric oxide synthesis in streptozotocin-induced diabetic rats.
J Nutr, M University, College Station, TX 77843, USA., **2004**, Vol. 134(3), pp. 600-608

Kotchen1997

Kotchen, T.A., Reddy, S. & Zhang, H.Y.
Increasing insulin sensitivity lowers blood pressure in the fructose-fed rat.
Am J Hypertens, Department of Medicine, Medical College of Wisconsin, Milwaukee, 53226, USA., **1997**, Vol. 10(9 Pt 1), pp. 1020-1026

Kuhlmann2008

Kuhlmann, Dieter Walb, J.B.F.L.
Nephrologie: Pathophysiologie - Klinik - Nierenersatzverfahren (Gebundene Ausgabe) 5., überarb. u. erw. Auflage.
Thieme, **2008**

Kumar2009

Kumar, P., Kaundal, R.K., More, S. & Sharma, S.S.
Beneficial effects of pioglitazone on cognitive impairment in MPTP model of Parkinson's disease.
Behav Brain Res, Department of Pharmacology and Toxicology, National Institute of Pharmaceutical Education and Research, Sector-67, S.A.S. Nagar, Punjab 160062, India., **2009**, Vol. 197(2), pp. 398-403

Kwon2009

Kwon, O., Hong, S.-M. & Ramesh, G.
Diminished NO generation by injured endothelium and loss of macula densa nNOS may contribute to sustained acute kidney injury after ischemia-reperfusion.
Am J Physiol Renal Physiol, Dept. of Medicine, Div. of Nephrology, Penn State Milton S. Hershey Medical Ctr., Penn State College of Medicine, 500 University Dr., Hershey, PA 17033-0850, USA. okwon@psu.edu, **2009**, Vol. 296(1), pp. F25-F33

Lameire2005c

Lameire, N., Biesen, W.V. & Vanholder, R.
Acute renal failure.
Lancet, Renal Division, Department of Medicine, University Hospital Ghent, De Pintelaan 185, 9000 Ghent, Belgium. norbert.lameire@ugent.be, **2005**, Vol. 365(9457), pp. 417-430

Lee2009

Lee, C.-S., Kwon, Y.-W., Yang, H.-M., Kim, S.-H., Kim, T.-Y., Hur, J., Park, K.-W., Cho, H.-J., Kang, H.-J., Park, Y.-B. & Kim, H.-S.
New mechanism of rosiglitazone to reduce neointimal hyperplasia: activation of glycogen synthase kinase-3beta followed by inhibition of MMP-9.
Arterioscler Thromb Vasc Biol, Innovative Research Institute for Cell Therapy (IRICT), Seoul National University Hospital, Seoul National University College of Medicine, Seoul, Korea., **2009**, Vol. 29(4), pp. 472-479

Leiper1999

Leiper, J. & Vallance, P.
Biological significance of endogenous methylarginines that inhibit nitric oxide synthases.
Cardiovasc Res, Therapeutics, University College London, UK. james.leiper@ucl.ac.uk, **1999**, Vol. 43(3), pp. 542-548

Letavernier2005

Letavernier, E., Perez, J., Joye, E., Bellocq, A., Fouqueray, B., Haymann, J.-P., Heudes, D., Wahli, W., Desvergne, B. & Baud, L.
Peroxisome proliferator-activated receptor beta/delta exerts a strong protection from ischemic acute renal failure.
J Am Soc Nephrol, INSERM U489, Hôpital Tenon, 4 rue de la Chine, Paris, France 75020., **2005**, Vol. 16(8), pp. 2395-2402

Li2008

Li, Y., Wu, J., Shou, Z., He, Q., Zhang, P., Han, F., Li, H. & Chen, J.
Pretreatment with granulocyte colony-stimulating factor attenuated renal ischaemia and reperfusion injury via activation of PI3/Akt signal pathway.
Nephrology (Carlton), Kidney Disease Centre, First Affiliated Hospital, Medical College of Zhejiang University, Hangzhou, Zhejiang, China., **2008**, Vol. 13(6), pp. 508-516

Liu2004

Liu, H.-R., Tao, L., Gao, E., Lopez, B.L., Christopher, T.A., Willette, R.N., Ohlstein, E.H., Yue, T.-L. & Ma, X.-L.
Anti-apoptotic effects of rosiglitazone in hypercholesterolemic rabbits subjected to myocardial ischemia and reperfusion.
Cardiovasc Res, Department of Emergency Medicine, Thomas Jefferson University, 1020 Sansom Street, Thompson Building, Room 241, Philadelphia, PA 19107, USA., **2004**, Vol. 62(1), pp. 135-144

Liu2007

Liu, X., Chen, H., Zhan, B., Xing, B., Zhou, J., Zhu, H. & Chen, Z.
Attenuation of reperfusion injury by renal ischemic postconditioning: the role of NO.
Biochem Biophys Res Commun, Department of Urology, Renmin Hospital of Wuhan University, Jiefang Road 238, Wuhan 430060, China. drliuxiuheng@163.com, **2007**, Vol. 359(3), pp. 628-634

Liu2008

Liu, H., Qu, X., Liang, Z., Chen, W., Xia, W. & Song, Y.
Variance of DDAH/PRMT/ADMA pathway in atrial fibrillation dogs.
Biochem Biophys Res Commun, Department of Cardiology, The First Affiliated Hospital of Harbin Medical University, 23 Youzheng Street, Nangang District, Harbin 150001, PR China., **2008**, Vol. 377(3), pp. 884-888

Marx1998

Marx, N., Schönbeck, U., Lazar, M.A., Libby, P. & Plutzky, J.
Peroxisome proliferator-activated receptor gamma activators inhibit gene expression and migration in human vascular smooth muscle cells.
Circ Res, Vascular Medicine and Atherosclerosis Unit, Cardiovascular Division, Department of Medicine, Brigham and Women's Hospital, Harvard Medical School, Boston, MA, USA., **1998**, Vol. 83(11), pp. 1097-1103

Marx1999

Marx, N., Bourcier, T., Sukhova, G.K., Libby, P. & Plutzky, J.
PPARgamma activation in human endothelial cells increases plasminogen activator inhibitor type-1 expression: PPARgamma as a potential mediator in vascular disease.
Arterioscler Thromb Vasc Biol, Vascular Medicine and Atherosclerosis Unit, Cardiovascular Division, Brigham and Women's Hospital, Harvard Medical School, Boston, MA, USA., **1999**, Vol. 19(3), pp. 546-551

Mark2005

Mark, L.A., Robinson, A.V. & Schulak, J.A.
Inhibition of nitric oxide synthase reduces renal ischemia/reperfusion injury.
J Surg Res, Department of Surgery, Case Western Reserve University School of Medicine, Cleveland, Ohio 44106, USA., **2005**, Vol. 129(2), pp. 236-241

Matsuguma2006

Matsuguma, K., Ueda, S., Ichi Yamagishi, S., Matsumoto, Y., Kaneyuki, U., Shibata, R., Fujimura, T., Matsuoka, H., Kimoto, M., Kato, S., Imaizumi, T. & Okuda, S.
Molecular mechanism for elevation of asymmetric dimethylarginine and its role for hypertension in chronic kidney disease.
J Am Soc Nephrol, Division of Nephrology, Kurume University, School of Medicine, Kurume, Japan., **2006**, Vol. 17(8), pp. 2176-2183

Matsumoto2007

Matsumoto, Y., Ueda, S., Ichi Yamagishi, S., Matsuguma, K., Shibata, R., Fukami, K., Matsuoka, H., Imaizumi, T. & Okuda, S.
Dimethylarginine dimethylaminohydrolase prevents progression of renal dysfunction by inhibiting loss of peritubular capillaries and tubulointerstitial fibrosis in a rat model of chronic kidney disease.
J Am Soc Nephrol, Division of Nephrology, Department of Medicine, Kurume University, School of Medicine, Kurume, Japan., **2007**, Vol. 18(5), pp. 1525-1533

McDonald1997

McDonald, K.K., Zharikov, S., Block, E.R. & Kilberg, M.S.
A caveolar complex between the cationic amino acid transporter 1 and endothelial nitric-oxide synthase may explain the "arginine paradox".
J Biol Chem, Department of Biochemistry and Molecular Biology and the Center for Structural Biology, University of Florida College of Medicine, Gainesville, Florida 32610-0245, USA., **1997**, Vol. 272(50), pp. 31213-31216

Mehta2007a

Mehta, R.L., Kellum, J.A., Shah, S.V., Molitoris, B.A., Ronco, C., Warnock, D.G., Levin, A. & Network, A.K.I.
Acute Kidney Injury Network: report of an initiative to improve outcomes in acute kidney injury.
Crit Care, Department of Medicine, University of California San Diego Medical Center 8342, 200 W, Arbor Drive, San Diego, CA 92103, USA. rmehta@ucsd.edu, **2007**, Vol. 11(2), pp. R31

Meinitzer2007

Meinitzer, A., Seelhorst, U., Wellnitz, B., Halwachs-Baumann, G., Boehm, B.O., Winkelmann, B.R. & März, W.
Asymmetrical dimethylarginine independently predicts total and cardiovascular mortality in individuals with angiographic coronary artery disease (the Ludwigshafen Risk and Cardiovascular Health study).
Clin Chem, Clinical Institute of Medical and Chemical Laboratory Diagnostics, Medical University of Graz, Graz, Austria., **2007**, Vol. 53(2), pp. 273-283

Michell2002

Michell, B.J., Harris, M.B., Chen, Z.-P., Ju, H., Venema, V.J., Blackstone, M.A., Huang, W., Venema, R.C. & Kemp, B.E.
Identification of regulatory sites of phosphorylation of the bovine endothelial nitric-oxide synthase at serine 617 and serine 635.
J Biol Chem, St. Vincent's Institute of Medical Research, Fitzroy, Victoria 3065, Australia., **2002**, Vol. 277(44), pp. 42344-42351

Muegge1991b

Mügge, A. & Harrison, D.G.
L-arginine does not restore endothelial dysfunction in atherosclerotic rabbit aorta in vitro.
Blood Vessels, Cardiovascular Center, University of Iowa College of Medicine, Iowa City., **1991**, Vol. 28(5), pp. 354-357

Nakajima2001

Nakajima, A., Wada, K., Miki, H., Kubota, N., Nakajima, N., Terauchi, Y., Ohnishi, S., Saubermann, L.J., Kadowaki, T., Blumberg, R.S., Nagai, R. & Matsushashi, N.
Endogenous PPAR gamma mediates anti-inflammatory activity in murine ischemia-reperfusion injury.
Gastroenterology, Gastroenterology Division, Brigham and Women's Hospital and Harvard Medical School, Boston, Massachusetts 02115, USA., **2001**, Vol. 120(2), pp. 460-469

Nakajima2008

Nakajima, A., Tomimoto, A., Fujita, K., Sugiyama, M., Takahashi, H., Ikeda, I., Hosono, K., Endo, H., Yoneda, K., Iida, H., Inamori, M., Kubota, K., Saito, S., Nakajima, N., Wada, K., Nagashima, Y. & Nakagama, H.
Inhibition of peroxisome proliferator-activated receptor gamma activity suppresses pancreatic cancer cell motility.
Cancer Sci, Division of Gastroenterology, Yokohama City University School of Medicine, Yokohama, Japan., **2008**, Vol. 99(10), pp. 1892-1900

Nijveldt2003

Nijveldt, R.J., Teerlink, T., van Guldener, C., Prins, H.A., van Lambalgen, A.A., Stehouwer, C.D.A., Rauwerda, J.A. & van Leeuwen, P.A.M.
Handling of asymmetrical dimethylarginine and symmetrical dimethylarginine by the rat kidney under basal conditions and during endotoxaemia.
Nephrol Dial Transplant, Department of Surgery, VU University Medical Center, 1007 MB Amsterdam, The Netherlands., **2003**, Vol. 18(12), pp. 2542-2550

Nijveldt2003a

Nijveldt, R.J., Teerlink, T., Hoven, B.V.D., Siroen, M.P.C., Kuik, D.J., Rauwerda, J.A. & van Leeuwen, P.A.M.
Asymmetrical dimethylarginine (ADMA) in critically ill patients: high plasma ADMA concentration is an independent risk factor of ICU mortality.
Clin Nutr, Department of Surgery, Institute for Cardiovascular Research-VU / VU University Medical Center, 1007 MB Amsterdam, The Netherlands., **2003**, Vol. 22(1), pp. 23-30

Noiri1996

Noiri, E., Peresleni, T., Miller, F. & Goligorsky, M.S.
In vivo targeting of inducible NO synthase with oligodeoxynucleotides protects rat kidney against ischemia.
J Clin Invest, Department of Medicine, State University of New York, Stony Brook 11794-8152, USA., **1996**, Vol. 97(10), pp. 2377-2383

Okada2002

Okada, M., Yan, S.F. & Pinsky, D.J.
Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma (PPAR-gamma) activation suppresses ischemic induction of Egr-1 and its inflammatory gene targets.
FASEB J, Surgeons of Columbia University, New York, New York 10032, USA., **2002**, Vol. 16(14), pp. 1861-1868

Osanai2003

Osanai, T., Saitoh, M., Sasaki, S., Tomita, H., Matsunaga, T. & Okumura, K.
Effect of shear stress on asymmetric dimethylarginine release from vascular endothelial cells.
Hypertension, Second Department of Internal Medicine, Hirosaki University School of Medicine, 5 Zaifu-cho, Hirosaki, 036-8562 Japan. osanait@cc.hirosaki-u.ac.jp, **2003**, Vol. 42(5), pp. 985-990

Pacher2007

Pacher, P., Beckman, J.S. & Liaudet, L.
Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease.
Physiol Rev, Section on Oxidative Stress Tissue Injury, Laboratory of Physiologic Studies, National Institutes of Health, National Institute of Alcohol Abuse and Alcoholism, Bethesda, Maryland, USA. pacher@mail.nih.gov, **2007**, Vol. 87(1), pp. 315-424

Palm2007

Palm, F., Onozato, M.L., Luo, Z. & Wilcox, C.S.
Dimethylarginine dimethylaminohydrolase (DDAH): expression, regulation, and function in the cardiovascular and renal systems.
Am J Physiol Heart Circ Physiol, Division of Nephrology and Hypertension, Georgetown University, 3800 Reservoir Road N.W., Washington, DC 20007, USA., **2007**, Vol. 293(6), pp. H3227-H3245

Paola2006

Paola, R.D., Mazzon, E., Maiere, D., Zito, D., Britti, D., Majo, M.D., Genovese, T. & Cuzzocrea, S.
Rosiglitazone reduces the evolution of experimental periodontitis in the rat.
J Dent Res, Department of Clinical and Experimental Medicine and Pharmacology,
Torre Biologica, Policlinico Universitario, Via C. Valeria, Gazzi, 98100 Messina, Italy.,
2006, Vol. 85(2), pp. 156-161

Park2004

Park, K.M., Kim, J.I., Ahn, Y., Bonventre, A.J. & Bonventre, J.V.
Testosterone is responsible for enhanced susceptibility of males to ischemic renal injury.
J Biol Chem, Renal Division, Brigham and Women's Hospital, Department of Medicine,
Harvard Medical School, Boston, Massachusetts 02115, USA., **2004**, Vol. 279(50), pp.
52282-52292

Polikandriotis2005

Polikandriotis JA, Mazzella LJ, R.H.H.C.
Peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligands stimulate endothelial nitric oxide production through distinct peroxisome proliferator-activated receptor gamma-dependent mechanisms
Arterioscler Thromb Vasc Biol, **2005**, Vol. 9, pp. 1810-6

Potenza2009

Potenza, M.A., Gagliardi, S., Benedictis, L.D., Zigrino, A., Tiravanti, E., Colantuono, G., Federici, A., Lorusso, L., Benagiano, V., Quon, M.J. & Montagnani, M.
Treatment of spontaneously hypertensive rats with rosiglitazone ameliorates cardiovascular pathophysiology via antioxidant mechanisms in the vasculature.
Am J Physiol Endocrinol Metab, Dept. of Pharmacology and Human Physiology,
Medical School, Univ. of Bari, Policlinico-Piazza G. Cesare, 11, 70124 Bari, Italy., **2009**,
Vol. 297(3), pp. E685-E694

Raff2005

Raff, U., Schneider, R., Gambaryan, S., Seibold, S., Reber, M., Vornberger, N., Freund, R., Schramm, L., Wanner, C. & Galle, J.
L-Arginine does not affect renal morphology and cell survival in ischemic acute renal failure in rats.
Nephron Physiol, Division of Nephrology, Department of Medicine, Julius Maximilian University, Würzburg, Germany., **2005**, Vol. 101(3), pp. p39-p50

Ricci2008

Ricci, Z., Cruz, D. & Ronco, C.
The RIFLE criteria and mortality in acute kidney injury: A systematic review.
Kidney Int, Department of Pediatric Cardiosurgery, Bambino Gesù Hospital, Rome, Italy. z.ricci@libero.it, **2008**, Vol. 73(5), pp. 538-546

Richir2009

Richir, M.C., Ellger, B., Teerlink, T., Siroen, M.P.C., Visser, M., Spreeuwenberg, M., Girbes, A.R.J., van der Hoven, B., van den Berghe, G., Wilhelm, A.J., de Vries, T.P.G.M. & van Leeuwen, P.A.M.
The effect of rosiglitazone on asymmetric dimethylarginine (ADMA) in critically ill patients.
Pharmacol Res, Department of Surgery, VU University Medical Center, Amsterdam, The Netherlands; Department of Clinical Pharmacology and Pharmacy, VU University Medical Center, Amsterdam, The Netherlands., **2009**

Rodriguez-Reynoso2004

Rodríguez-Reynoso, S., Leal, C., de Buen, E.P., Castillo, J.C. & Ramos-Solano, F.
Melatonin ameliorates renal ischemia/reperfusion injury.
J Surg Res, Surgical Research Division, Centro de Investigación Biomédica de Occidente, IMSS, Guadalajara, Jal. México Mexico., **2004**, Vol. 116(2), pp. 242-247

Rodriguez-Reynoso2004a

Rodríguez-Reynoso, S., Leal, C., de Buen, E.P., Castillo, J.C. & Ramos-Solano, F.
Melatonin ameliorates renal ischemia/reperfusion injury.
J Surg Res, Surgical Research Division, Centro de Investigación Biomédica de Occidente, IMSS, Guadalajara, Jal. México Mexico., **2004**, Vol. 116(2), pp. 242-247

Satake2008

Satake, A., Takaoka, M., Nishikawa, M., Yuba, M., Shibata, Y., Okumura, K., Kitano, K., Tsutsui, H., Fujii, K., Kobuchi, S., Ohkita, M. & Matsumura, Y.
Protective effect of 17beta-estradiol on ischemic acute renal failure through the PI3K/Akt/eNOS pathway.
Kidney Int, Laboratory of Pathological and Molecular Pharmacology, Osaka University of Pharmaceutical Sciences, Takatsuki, Osaka, Japan., **2008**, Vol. 73(3), pp. 308-317

Schneider2003

Schneider, R., Raff, U., Vornberger, N., Schmidt, M., Freund, R., Reber, M., Schramm, L., Gambaryan, S., Wanner, C., Schmidt, H.H.H.W. & Galle, J.
L-Arginine counteracts nitric oxide deficiency and improves the recovery phase of ischemic acute renal failure in rats.
Kidney Int, Division of Nephrology, Department of Medicine, Julius-Maximilians-University, Würzburg, Germany., **2003**, Vol. 64(1), pp. 216-225

Schneider2007

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, Institute of Physiology, Division of Nephrology, University of Würzburg, Würzburg, Germany., **2007**, Vol. 292(5), pp. F1599-F1605

Schramm1994

Schramm, L., Heidbreder, E., Schmitt, A., Kartenbender, K., Zimmermann, J., Ling, H. & Heidland, A.
Role of L-arginine-derived NO in ischemic acute renal failure in the rat.
Ren Fail, Department of Nephrology, University of Würzburg, Germany., **1994**, Vol. 16(5), pp. 555-569

Schramm2002

Schramm, L., La, M., Heidbreder, E., Hecker, M., Beckman, J.S., Lopau, K., Zimmermann, J., Rendl, J., Reiners, C., Winderl, S., Wanner, C. & Schmidt, H.H.H.W.
L-arginine deficiency and supplementation in experimental acute renal failure and in human kidney transplantation.
Kidney Int, Department of Medicine, Division of Nephrology, Julius-Maximilians-University, Würzburg, Germany. L.schramm@dialyse-wuerzburg.de, **2002**, Vol. 61(4), pp. 1423-1432

Schrier2004

Schrier, R.W., Wang, W., Poole, B. & Mitra, A.
Acute renal failure: definitions, diagnosis, pathogenesis, and therapy.
J Clin Invest, Department of Medicine, University of Colorado Health Sciences Center, Denver, Colorado 80262, USA. robert.schrier@uchsc.edu, **2004**, Vol. 114(1), pp. 5-14

Schwartz1997

Schwartz, D., Mendonca, M., Schwartz, I., Xia, Y., Satriano, J., Wilson, C.B. & Blantz, R.C.

Inhibition of constitutive nitric oxide synthase (NOS) by nitric oxide generated by inducible NOS after lipopolysaccharide administration provokes renal dysfunction in rats.

J Clin Invest, California, San Diego, San Diego, California 92110, USA., **1997**, Vol. 100(2), pp. 439-448

Shiojiri2002

Shiojiri, T., Wada, K., Nakajima, A., Katayama, K., Shibuya, A., Kudo, C., Kadowaki, T., Mayumi, T., Yura, Y. & Kamisaki, Y.

PPAR gamma ligands inhibit nitrotyrosine formation and inflammatory mediator expressions in adjuvant-induced rheumatoid arthritis mice.

Eur J Pharmacol, Department of Pharmacology, Graduate School of Dentistry, Osaka University, 1-8 Yamadaoka, Suita, Osaka 565-0871, Japan., **2002**, Vol. 448(2-3), pp. 231-238

Sivarajah2003

Sivarajah, A., Chatterjee, P.K., Patel, N.S.A., Todorovic, Z., Hattori, Y., Brown, P.A.J., Stewart, K.N., Mota-Filipe, H., Cuzzocrea, S. & Thiernemann, C.

Agonists of peroxisome-proliferator activated receptor-gamma reduce renal ischemia/reperfusion injury.

Am J Nephrol, Department of Experimental Medicine and Nephrology, William Harvey Research Institute, Queen Mary-University of London, UK., **2003**, Vol. 23(4), pp. 267-276

Song2004

Song, J., Knepper, M.A., Hu, X., Verbalis, J.G. & Ecelbarger, C.A.

Rosiglitazone activates renal sodium- and water-reabsorptive pathways and lowers blood pressure in normal rats.

J Pharmacol Exp Ther, Department of Medicine, Georgetown University, Washington, DC 20057-1412, USA., **2004**, Vol. 308(2), pp. 426-433

Stuehlinger2002

Stuehlinger, M.C., Abbasi, F., Chu, J.W., Lamendola, C., McLaughlin, T.L., Cooke, J.P., Reaven, G.M. & Tsao, P.S.

Relationship between insulin resistance and an endogenous nitric oxide synthase inhibitor.

JAMA, Division of Cardiovascular Medicine, Stanford University School of Medicine, Falk Cardiovascular Research Center, 300 Pasteur Dr, Stanford, CA 94305, USA., **2002**, Vol. 287(11), pp. 1420-1426

Sugimoto2007

Sugimoto, M., Nakayama, M., Goto, T.M., Amano, M., Komori, K. & Kaibuchi, K.

Rho-kinase phosphorylates eNOS at threonine 495 in endothelial cells.

Biochem Biophys Res Commun, Department of Vascular Surgery, Graduate School of Medicine, Nagoya University, 65 Tsurumai, Showa-ku, Nagoya, Aichi 466-8550, Japan., **2007**, Vol. 361(2), pp. 462-467

Sydow2003

Sydow, K. & Münzel, T.

ADMA and oxidative stress.

Atheroscler Suppl, Falk Cardiovascular Research Center, Division of Cardiovascular Medicine, Stanford University School of Medicine, 300 Pasteur Drive, Stanford, CA 94305, USA. ksydow@cvmed.stanford.edu, **2003**, Vol. 4(4), pp. 41-51

Tran2003

Tran, C.T.L., Leiper, J.M. & Vallance, P.
The DDAH/ADMA/NOS pathway.
Atheroscler Suppl, Centre for Clinical Pharmacology and Therapeutics, BHF
Laboratories, Division of Medicine, University College London, 5 University Street,
London, WC1E 6JJ, UK., **2003**, Vol. 4(4), pp. 33-40

Tsikakos2000

Tsikakos, D., Böger, R.H., Sandmann, J., Bode-Böger, S.M. & Frölich, J.C.
Endogenous nitric oxide synthase inhibitors are responsible for the L-arginine paradox.
FEBS Lett, Institute of Clinical Pharmacology, Hannover Medical School, Carl-Neuberg-
Strasse 1, D-30623, Hannover, Germany. tsikakos.dimitros@mh-hannover.de, **2000**, Vol.
478(1-2), pp. 1-3

Valerio2006

Valerio, A., Cardile, A., Cozzi, V., Bracale, R., Tedesco, L., Pisconti, A., Palomba, L.,
Cantoni, O., Clementi, E., Moncada, S., Carruba, M.O. & Nisoli, E.
*TNF- α downregulates eNOS expression and mitochondrial biogenesis in fat and
muscle of obese rodents.*
J Clin Invest, Integrated Laboratories Network, Center for Study and Research on
Obesity, Department of Pharmacology, School of Medicine, University of Milan, Milan,
Italy., **2006**, Vol. 116(10), pp. 2791-2798

Vallance1992

Vallance, P., Leone, A., Calver, A., Collier, J. & Moncada, S.
*Accumulation of an endogenous inhibitor of nitric oxide synthesis in chronic renal
failure.*
Lancet, Wellcome Research Laboratories, Beckenham, Kent, UK., **1992**, Vol.
339(8793), pp. 572-575

Vallance2004

Vallance, P. & Leiper, J.
*Cardiovascular biology of the asymmetric dimethylarginine:dimethylarginine
dimethylaminohydrolase pathway.*
Arterioscler Thromb Vasc Biol, BHF Laboratories, Division of Medicine, University
College London, Rayne Institute, 5 University St, London WC1 6JJ, UK.
patrick.vallance@ucl.ac.uk, **2004**, Vol. 24(6), pp. 1023-1030

Vaziri1999

Vaziri, N.D. & Wang, X.Q.
*cGMP-mediated negative-feedback regulation of endothelial nitric oxide synthase
expression by nitric oxide.*
Hypertension, Division of Nephrology, Department of Medicine, University of California,
Irvine, Calif 92697, USA. tabotten@uci.edu, **1999**, Vol. 34(6), pp. 1237-1241

Villanueva2006

Villanueva, S., Cespedes, C., Gonzalez, A. & Vio, C.P.
*bFGF induces an earlier expression of nephrogenic proteins after ischemic acute renal
failure.*
Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, Dept. de Fisiologia, Pontificia Universidad
Catolica de Chile, Casilla 114-D, Santiago, Chile. svillanu@bio.puc.cl, **2006**, Vol.
291(6), pp. R1677-R1687

Villanueva2007

Villanueva, S., Céspedes, C., González, A.A., Vio, C.P. & Velarde, V.
Effect of ischemic acute renal damage on the expression of COX-2 and oxidative stress-related elements in rat kidney.
Am J Physiol Renal Physiol, Departamento de Fisiología, Pontificia Universidad Católica de Chile, Casilla 114-D, Santiago, Chile. svillanu@bio.puc.cl, **2007**, Vol. 292(5), pp. F1364-F1371

Volti2007

Volti, G.L., Sorrenti, V., Murabito, P., Galvano, F., Veroux, M., Gullo, A., Acquaviva, R., Stacchiotti, A., Bonomini, F., Vanella, L. & Giacomo, C.D.
Pharmacological induction of heme oxygenase-1 inhibits iNOS and oxidative stress in renal ischemia-reperfusion injury.
Transplant Proc, Department of Biological Chemistry, University of Catania, Catania, Italy. livolti@unict.it, **2007**, Vol. 39(10), pp. 2986-2991

Volti2008

Volti, G.L., Sorrenti, V., Acquaviva, R., Murabito, P., Gullo, A., Barcellona, M.L., Galvano, F., Rodella, L., Rezzani, R., Vanella, L., Tringali, G., Caruso, M., Gazzolo, D. & Giacomo, C.D.
Effect of ischemia-reperfusion on renal expression and activity of N(G)-N(G)-dimethylarginine dimethylaminohydrolases.
Anesthesiology, Department of Biological Chemistry, Medical Chemistry and Molecular Biology, University of Catania, Italy. livolti@unict.it, **2008**, Vol. 109(6), pp. 1054-1062

Wada2004

Wada, K., Nakajima, A., Takahashi, H., Yoneda, M., Fujisawa, N., Ohsawa, E., Kadowaki, T., Kubota, N., Terauchi, Y., Matsushashi, N., Saubermann, L.J., Nakajima, N. & Blumberg, R.S.
Protective effect of endogenous PPARgamma against acute gastric mucosal lesions associated with ischemia-reperfusion.
Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, Gastroenterology Division, Thorn 1419, Brigham and Women's Hospital and Harvard Medical School, 75 Francis St., Boston, MA 02115, USA., **2004**, Vol. 287(2), pp. G452-G458

Wada2006

Wada, K., Nakajima, A., Katayama, K., Kudo, C., Shibuya, A., Kubota, N., Terauchi, Y., Tachibana, M., Miyoshi, H., Kamisaki, Y., Mayumi, T., Kadowaki, T. & Blumberg, R.S.
Peroxisome proliferator-activated receptor gamma-mediated regulation of neural stem cell proliferation and differentiation.
J Biol Chem, Department of Pharmacology, Graduate School of Dentistry, Osaka University, 1-8 Yamadaoka, Suita, Osaka 565-0871, Japan. kwada@dent.osaka-u.ac.jp, **2006**, Vol. 281(18), pp. 12673-12681

Wakino2005

Wakino, S., Hayashi, K., Tatematsu, S., Hasegawa, K., Takamatsu, I., Kanda, T., Homma, K., Yoshioka, K., Sugano, N. & Saruta, T.
Pioglitazone lowers systemic asymmetric dimethylarginine by inducing dimethylarginine dimethylaminohydrolase in rats.
Hypertens Res, Department of Internal Medicine, School of Medicine, Keio University, 35 Shinanomachi, Shinjuku-ku, Tokyo 160-8582, Japan. swakino@sc.itc.keio.ac.jp, **2005**, Vol. 28(3), pp. 255-262

Walker1998

Walker, A.B., Naderali, E.K., Chattington, P.D., Buckingham, R.E. & Williams, G.
Differential vasoactive effects of the insulin sensitizers rosiglitazone (BRL 49653) and troglitazone on human small arteries in vitro.
Diabetes, Diabetes and Endocrinology Research Group, University of Liverpool, UK.,
1998, Vol. 47(5), pp. 810-814

Wang2004

Wang, W., Mitra, A., Poole, B., Falk, S., Lucia, M.S., Tayal, S. & Schrier, R.
Endothelial nitric oxide synthase-deficient mice exhibit increased susceptibility to endotoxin-induced acute renal failure.
Am J Physiol Renal Physiol, Dept. of Medicine, Univ. of Colorado Health Sciences Center, 4200 East 9th Avenue, Box C-281, Denver, CO 80262, USA., **2004**, Vol. 287(5), pp. F1044-F1048

Wang2007

Wang, S., Jiang, J.-L., Hu, C.-P., Zhang, X.-J., Yang, D.-L. & Li, Y.-J.
Relationship between protective effects of rosiglitazone on endothelium and endogenous nitric oxide synthase inhibitor in streptozotocin-induced diabetic rats and cultured endothelial cells.
Diabetes Metab Res Rev, School of Pharmaceutical Sciences, Central South University, Changsha 410078, China., **2007**, Vol. 23(2), pp. 157-164

Wells2007

Wells, S.M. & Holian, A.
Asymmetric dimethylarginine induces oxidative and nitrosative stress in murine lung epithelial cells.
Am J Respir Cell Mol Biol, Center for Environmental Health Sciences, Department of Biomedical and Pharmaceutical Sciences, University of Montana, Skaggs Building, Room 155, Missoula, MT 59812, USA. sandra.wells@umontana.edu, **2007**, Vol. 36(5), pp. 520-528

Wessells2006

Wessells, H., Teal, T.H., Luttrell, I.P. & Sullivan, C.J.
Effect of endothelial cell-based iNOS gene transfer on cavernosal eNOS expression and mouse erectile responses.
Int J Impot Res, Department of Urology, University of Washington School of Medicine and Harborview Medical Center, Seattle, WA, USA. wessells@u.washington.edu, **2006**, Vol. 18(5), pp. 438-445

Wojciak-Stothard2009

Wojciak-Stothard, B., Torondel, B., Zhao, L., Renné, T. & Leiper, J.M.
Modulation of Rac1 activity by ADMA/DDAH regulates pulmonary endothelial barrier function.
Mol Biol Cell, BHF Laboratories, Department of Medicine, University College London, United Kingdom. B.Wojciak-Stothard@ucl.ac.uk, **2009**, Vol. 20(1), pp. 33-42

Xie2006

Xie, L., Zheng, X., Qin, J., Chen, Z., Jin, Y. & Ding, W.
Role of PI3-kinase/Akt signalling pathway in renal function and cell proliferation after renal ischaemia/reperfusion injury in mice.
Nephrology (Carlton), Department of Urology, The First Affiliated Hospital, School of Medicine, Zhejiang University, Hangzhou, Zhejiang, China., **2006**, Vol. 11(3), pp. 207-212

Yamashita2003

Yamashita, J., Ogata, M., Itoh, M., Yamasowa, H., Shimeda, Y., Takaoka, M. & Matsumura, Y.

Role of nitric oxide in the renal protective effects of ischemic preconditioning.

J Cardiovasc Pharmacol, Department of Pharmacology, Osaka University of Pharmaceutical Sciences, Japan., **2003**, Vol. 42(3), pp. 419-427

Yamasowa2005

Yamasowa, H., Shimizu, S., Inoue, T., Takaoka, M. & Matsumura, Y.

Endothelial nitric oxide contributes to the renal protective effects of ischemic preconditioning.

J Pharmacol Exp Ther, Department of Pharmacology, Osaka University of Pharmaceutical Sciences, Nasahara, Takatsuki, Osaka, Japan., **2005**, Vol. 312(1), pp. 153-159

Ye2006

Ye, Y., Lin, Y., Atar, S., Huang, M.-H., Perez-Polo, J.R., Uretsky, B.F. & Birnbaum, Y.
Myocardial protection by pioglitazone, atorvastatin, and their combination: mechanisms and possible interactions.

Am J Physiol Heart Circ Physiol, Division of Cardiology, Department of Biochemistry and Molecular Genetics, University of Texas Medical Branch, 5.106 John Sealy Annex, 301 Univ. Blvd., Galveston, Texas 77555-0553, USA., **2006**, Vol. 291(3), pp. H1158-H1169

Ye2008

Ye, Y., Lin, Y., Manickavasagam, S., Perez-Polo, J.R., Tieu, B.C. & Birnbaum, Y.

Pioglitazone protects the myocardium against ischemia-reperfusion injury in eNOS and iNOS knockout mice.

Am J Physiol Heart Circ Physiol, Department of Biochemistry and Molecular Biology, Graduate School of Biomedical Science, University of Texas Medical Branch, Galveston, TX, USA., **2008**, Vol. 295(6), pp. H2436-H2446

Yki-Jaervinen2004

Yki-Järvinen, H.

Thiazolidinediones.

N Engl J Med, jarvi@cc.helsinki.fi, **2004**, Vol. 351(11), pp. 1106-1118

Yosefy2004

Yosefy, C., Magen, E., Kiselevich, A., Priluk, R., London, D., Volchek, L. & Viskoper, R.J.

Rosiglitazone improves, while Glibenclamide worsens blood pressure control in treated hypertensive diabetic and dyslipidemic subjects via modulation of insulin resistance and sympathetic activity.

J Cardiovasc Pharmacol, Noninvasive Cardiac Laboratory, Massachusetts General Hospital, Harvard Medical School, Boston, 02114-2696, USA. cyosefy@partners.org, **2004**, Vol. 44(2), pp. 215-222

Yoshimura2004

Yoshimura, R., Matsuyama, M., Segawa, Y., Tsuchida, K., Takemoto, Y., Kuratsukuri, K., Kawahito, Y., Shinka, T., Sano, H. & Nakatani, T.

Study of peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)-gamma in renal ischemia-reperfusion injury.

Transplant Proc, Department of Urology, Osaka University Graduate School of Medicine, Osaka, Japan., **2004**, Vol. 36(7), pp. 1946-1948

Zappitelli2008

Zappitelli, M., Parikh, C.R., Akcan-Arikan, A., Washburn, K.K., Moffett, B.S. & Goldstein, S.L.

Ascertainment and epidemiology of acute kidney injury varies with definition interpretation.

Clin J Am Soc Nephrol, Montreal Children's Hospital, 2300 Tupper, Room E-222, Montreal, QC H3H1P3, Canada. mzaprd@yahoo.ca, **2008**, Vol. 3(4), pp. 948-954

Zhou1997

Zhou, M., Wang, P. & Chaudry, I.H.

Endothelial nitric oxide synthase is downregulated during hyperdynamic sepsis.

Biochim Biophys Acta, Department of Surgery, Brown University School of Medicine and Rhode Island Hospital, Providence 02903, USA., **1997**, Vol. 1335(1-2), pp. 182-190

Zoccali2001

Zoccali, C., Bode-Böger, S., Mallamaci, F., Benedetto, F., Tripepi, G., Malatino, L., Cataliotti, A., Bellanuova, I., Fermo, I., Frölich, J. & Böger, R.

Plasma concentration of asymmetrical dimethylarginine and mortality in patients with end-stage renal disease: a prospective study.

Lancet, CNR Centre of Clinical Physiology and Renal Unit, C, Reggio, Italy., **2001**, Vol. 358(9299), pp. 2113-2117

Zoccali2002

Zoccali, C., Benedetto, F.A., Maas, R., Mallamaci, F., Tripepi, G., Malatino, L.S., Böger, R. & Investigators, C.R.E.E.D.

Asymmetric dimethylarginine, C-reactive protein, and carotid intima-media thickness in end-stage renal disease.

J Am Soc Nephrol, CNR Centre of Clinical Physiology and Renal Unit, Morelli Hospital, Reggio, Calabria, Italy. carmine.zoccali@tin.it, **2002**, Vol. 13(2), pp. 490-496

Zoccali2002a

Zoccali, C., Mallamaci, F., Maas, R., Benedetto, F.A., Tripepi, G., Malatino, L.S., Cataliotti, A., Bellanuova, I., Böger, R. & Investigators, C.R.E.E.D.

Left ventricular hypertrophy, cardiac remodeling and asymmetric dimethylarginine (ADMA) in hemodialysis patients.

Kidney Int, CNR, Division of Nephrology, Centre of Clinical Physiology and Renal Unit, Via Sbarre Inferiori 39, 89131 Reggio Calabria, Italy. carmine.zoccali@tin.it, **2002**, Vol. 62(1), pp. 339-345

DANKSAGUNG

Herrn Prof. Dr. med. Christoph Wanner gilt mein Dank für die Möglichkeit die Arbeit in der nephrologischen Abteilung der Universitätsklinik durchzuführen.

Herrn PD Dr. rer. nat. Christoph Sauvant danke ich für die Bereitstellung des Themas und seine konstruktiven Anregungen.

Herrn Dr. med. Reinhard Schneider, dem direkten Betreuer der Arbeit, danke ich für sehr engagierte Betreuung bei der Planung, Durchführung und Fertigstellung dieser Arbeit.

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

Persönliche Daten

Anschrift: Steinheilstrasse 6
97080 Würzburg

Geburtsdatum: 02. August. 1980

Geburtsort: Ludwigshafen am Rhein

Familienstand: ledig

Staatsangehörigkeit: deutsch

Konfession: römisch-katholisch

Ausbildung

1987 - 1991 Grundschulen Fulda und Motten

1991 - 2000 Rabanus-Maurus-Gymnasium, Fulda
Allgemeine Hochschulreife

07/2000-04/2001 Wehrdienstzeit

04/2001 - 06/2007 Studium der Humanmedizin
An der Julius-Maximilians-Universität Würzburg
Staatsexamen

07/2007 Approbation

12/2007 USMLE (United States Medical Licensing Examination) Step 1

03/2008 USMLE Step 2

Seit 06/2008 Wissenschaftlicher Assistenzarzt
in der nephrologischen Abteilung der Medizinischen Klinik
und Poliklinik I des Universitätsklinikums Würzburg

Famulaturen/Praktisches Jahr

09/2003	Endokrinologische Abteilung, Universitätsklinik Würzburg
03/2004	Chirurgische Abteilung, Herz-Jesu-Krankenhaus Fulda
03/2005	Gemeinschaftspraxis Anästhesiologie Dres. Skrobek/Jarauschk/Zeisel, Würzburg
08/2005	Neurologische Abteilung, Juliusspital Würzburg
09/2005	Gastroenterologische Abteilung, Kreiskrankenhaus Eckernförde
03/2006	1. Tertial des Praktischen Jahres Chirurgische Abteilung, Leopoldina Krankenhaus Schweinfurt
07/2006	2. Tertial des Praktischen Jahres Urologische Abteilung, Universitätsklinik Würzburg
11/2006	3. Tertial des Praktischen Jahres Onkologische Abteilung und Intermediate Care Station, Universitätsklinik Würzburg

Weitere Tätigkeiten und Kenntnisse

2001	Englisch für Mediziner
2002	Anatomisches Praktikum für Fortgeschrittene
2006	Wahlfach Einführung in die Sonographie
2009	Kompaktkurs: Versuchstiere, Tierversuche und Ersatzmethoden, GV SOLAS Berlin

Publikationen

„Downregulation of organic anion transporters OAT1 and OAT3 correlates with impaired secretion of para-aminohippurate after ischemic acute renal failure in rats”
R. Schneider, C. Sauviant, B. Betz, M. Otremba, D. Fischer, H. Holzinger, C. Wanner, J. Galle and M. Gekle, Am J Physiol Renal Physiol 292:F1599-F1605, 2007

Vortrag auf dem Deutschen Kongress
für Nephrologie in Göttingen:

„Das L-Arginin Paradox und die Regulation von ADMA, SDMA und L-Arginin im akuten ischämischen Nierenversagen“

B. Betz; R. Schneider; T. Kress; R. H. Böger; C. Wanner; C. Sauviant [2009] Nieren- und Hochdruckkrankheiten 38: 445, Abstract

Posterpräsentation auf dem Deutschen Kongress
für Nephrologie in Göttingen:

„Protektive Beeinflussung der eNOS/iNOS Dysbalance durch Rosiglitazone im akuten ischämischen Nierenversagen - Einfluss auf Apoptose und Inflammation“

B. Betz; R. Schneider; T. Kress; C. Wanner; C. Sauviant [2009] Nieren- und Hochdruckkrankheiten 38: 422, Abstract

Würzburg, 09.11.2009