

Medizinische Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

**Die Wirkung selektiver Cyclooxygenase-1- und Cyclooxygenase-2-
Inhibition auf die Expression renaler Transporter für organische Anionen
und die Nierenfunktion nach Ischämie und Reperfusion im Rattenmodell**

Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Medizin (Dr. med.)

vorgelegt
der Medizinischen Fakultät
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Ariane Braun geb. Bischoff

geboren am 21.03.1985 in Magdeburg

Betreuer: Prof. M. Bucher

Gutachter: Prof. Dr. M. Bucher
Prof. Dr. O. Thews
Prof. Dr. M. Weigand (Heidelberg)

09.07.2019

08.01.2020

Meinen Eltern

Referat

Bisherige Studien am Tiermodell der Ratte zeigten eine durch den unselektiven COX (Cyclooxygenase)-hemmer Indomethacin (Dosierung 1mg/kg Körpergewicht) induzierte Verbesserung der Expression und Funktionalität der renalen organischen Anionentransporter Oat1 und Oat3 nach Minderperfusion der Niere. Zudem verbesserte sich das renale Outcome durch Indomethacin nach Ischämie- und Reperfusionsschaden deutlich. Nach Nachweis positiver Effekte von COX-1- und COX-2-Hemmern in der Zellkultur untersuchten wir den Effekt von SC560 (COX-1-Hemmer) und SC58126 (COX-2-Hemmer) auf die Expression von Oat1/3 und auf Parameter der Nierenfunktion nach ischämischen akutem Nierenversagen (iAKV) im Versuchstiermodell der Ratte.

Das iAKI wurde durch bilaterales temporäres Abklemmen der Nierenarterien induziert. Die selektiven COX-Hemmer SC560 respektive SC58125 (Dosierung jeweils 1mg/kg Körpergewicht) wurden kurz vor Beginn der Reperusionsphase appliziert. Scheinoperierte Versuchstiere dienten als Vergleichskontrolle. Die Expression von Oat1/3 wurde mittels qPCR und Western Blot ermittelt. Des Weiteren wurden die GFR (glomeruläre Filtrationsrate), PAH (para-Aminohippursäure)-Clearance und das PAH-Extraktionsverhältnis bestimmt und der renale Plasmafluss berechnet. Alle Parameter wurden 24 Stunden nach Beginn der Ischämie detektiert.

Die Applikation des COX-1-Inhibitors SC560 bewirkte in der Gruppe der Ischämietiere eine Restitutio der Expression von Oat1/3 und der Perfusion der Niere. Darüber hinaus verbesserte sich das renale Outcome, gemessen anhand der GFR, erheblich. Die Verwendung des COX-2-Inhibitors SC58125 konnte diese Resultate nicht erzielen. Zusammenfassend deutet diese Arbeit darauf hin, dass die postischämische Anwendung des selektiven COX-1-Hemmers SC560 die durch Minderperfusion induzierte Herunterregulation von Oat1/3 während der Reperfusion verhindert und einen protektiven Effekt auf die Nierenfunktion hat.

Braun, Ariane: Die Wirkung selektiver Cyclooxygenase-1- und Cyclooxygenase-2-Inhibition auf die Expression renaler Transporter für organische Anionen und das renale Outcome nach Ischämie und Reperfusion im Rattenmodell, Halle (Saale), Univ., Med. Fak.; Diss., 78 Seiten, 2019

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Die akute Nierenschädigung	1
1.1.1	Definition	1
1.2	Epidemiologie und klinischer Stellenwert	2
1.2.1	Ätiologie	3
1.2.2	Pathophysiologie	4
1.2.3	Prävention und Risikostratifizierung	8
1.2.4	Therapie und Erholung	9
1.3	Prostaglandine E ₂ im akuten Nierenversagen	10
1.4	Cyclooxygenasen	11
1.3.1	Die Isoformen COX-1 und COX-2	11
1.3.2	Die COX-Inhibitoren Indomethacin, SC560 und SC58125	11
1.4	Transportsystem organischer Anionen der proximalen Tubuluszelle der Niere	13
1.5	Renaler Plasmafluss und PAH-Clearance	16
2	Zielstellung	18
3	Material und Methodik	19
3.1	Allgemeines	19
3.2	In vivo-Modell des ischämisch induzierten akuten Nierenversagens	19
3.3	Messung der Clearance, Probengewinnung und Organentnahme	21
3.4	Einteilung der Versuchstiergruppen	22
3.5	Messung der Fluorescein-Aufnahme in vitro	23
3.6	Parameter der renalen Funktion	25
3.6.1	Bestimmung der glomerulären Filtrationsrate	25
3.6.2	Bestimmung des renalen Plasmaflusses	26
3.6.3	Bestimmung der korrigierten PAH-Clearance	27
3.7	Western Blot	28
3.7.1	Probenaufbereitung	28
3.7.2	Probenanalyse	28
3.8	Real-Time PCR	30

3.9	Caspase-3-Aktivitätsassay	31
3.10	Statistik	32
4	Ergebnisse	33
4.1	Der Effekt selektiver COX-Hemmer auf die Aufnahme organischer Anionen in die proximale Tubuluszelle der Niere	33
4.2	Der Effekt selektiver COX-Inhibitoren auf die Expression der organischen Anionentransporter Oat1 und Oat3	36
4.3	Der Effekt selektiver COX-Inhibitoren auf das PAH-Extraktionsverhältnis	41
4.4	Der Effekt selektiver COX-Inhibitoren auf Funktionsparameter der Niere	43
4.5	Der Effekt selektiver COX-Inhibitoren auf Parameter der renalen Dysfunktion	46
5	Diskussion	50
5.1	Fragestellung	50
5.2	Methodik	50
5.3	Die selektiven COX-Hemmer SC560 (COX1) und SC58125 (COX2)	52
5.4	Funktionsparameter der Niere	53
5.5	Stellenwert inflammatorischer und zelluärer Prozesse	56
5.6	Die Beeinflussung des renalen Blutflusses durch selektive COX-Inhibitoren	58
6	Zusammenfassung	61
7	Literaturverzeichnis	63
8	Thesen	78

Selbstständigkeitserklärung

Erklärung über frühere Promotionsversuche

Danksagung

Abkürzungen

AKI	Acute Kidney Injury
AKIN	Acute Kidney Injury Network
ATP	Adenosintriphosphat
COX	Cyclooxygenase
FCS	Fetal Calf Serum
GFR	glomeruläre Filtrationsrate
(h)MRP	(human) multidrug resistance-associated protein
iANV	ischämisch bedingtes akutes Nierenversagen
IC50	mittlere inhibitorische Konzentration
iNOS	induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase
IPC	<i>ischemic preconditioning</i> , ischämische Präkonditionierung
KDIGO	Kidney Disease Improving Global Outcomes
KG	Körpergewicht
MCP-1	Makrophagen-Chemoattraktorprotein-1
Na ⁺ -K ⁺ -ATPase	Natrium-Kalium-ATPase
iNOS	induzierbare NO-Synthase
NO	Stickstoffmonoxid
NSAIDs	non-steroidal antiinflammatory drugs
OAT	organischer Anionentransporter
OK	Opposum Kidney
PAH	para-Aminohippursäure
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> , Polymerase-Kettenreaktion
PG	Prostaglandin
PNS	PAH-Nettosekretion
RBF	renaler Blutfluss
RPF	renaler Plasmafluss
RRT	Renal Replacement Therapy
RT-PCR	Real-Time-PCR
TGF	Tubuloglomerulärer Rückkopplungsmechanismus

1 Einleitung

1.1 Die akute Nierenschädigung

1.1.1 Definition

Das akute Nierenversagen (ANV), auch bezeichnet als akute Niereninsuffizienz, ist definiert als ein akut (innerhalb von 48 Stunden) eintretender, jedoch prinzipiell reversibler Funktionsverlust der Niere mit Abnahme der glomerulären Filtrationsrate (GFR). Die Folgen sind eine Kumulation harnpflichtiger Substanzen und eine Entgleisung des Elektrolyt- (Hyperkaliämie), Flüssigkeits- (Hypervolämie) und Säure-Basen-Haushalts (metabolische Azidose) mit der Gefahr einer Urämie.

Lange Zeit gab es keine standardisierten Kriterien für die Definition und Stadieneinteilung eines ANV. Es existierten bis zu 35 verschiedene Einteilungen in der Literatur (Kellum et al., 2002) mit entsprechend hoher Schwankungsbreite bei der Angabe von Prävalenz mit 1% bis 25% und Mortalität mit 15% bis über 60% (Brivet et al., 1996; Uchino et al., 2005), was eine Vergleichbarkeit klinischer Studienergebnisse und Therapieerfolge unmöglich machte.

Zur Schaffung einer einheitlichen Definition wurden 2004 die RIFLE-Kriterien eingeführt (Bellomo et al., 2004). RIFLE steht dabei als Akronym für die fünf unterschiedlichen Stadien des Nierenversagens mit zunehmenden Schweregrad: *Risk*, *Injury*, *Failure*, *Loss* und *End-Stage Kidney Disease* und basiert auf einer Einteilung unter Zuhilfenahme der Parameter Serumkreatinin, Diurese und Dauer des Funktionsverlustes der Niere. Eine Modifizierung und Vereinfachung erfolgte 2007 durch das Acute Kidney Injury Network in die AKIN-Kriterien (Mehta et al., 2007). Dabei liegt ein ANV vor, wenn innerhalb von 48 Stunden ein absoluter Anstieg des Serumkreatinins von 0,3 mg/dl, ein prozentualer Kreatininanstieg um das 1,5-fache des Ausgangswertes oder eine Abnahme der Diurese um $< 0,5$ ml/kg Körpergewicht/h über mehr als 6 Stunden vorliegt. Die beiden letzten Stadien der RIFLE-Einteilung finden in der AKIN-Klassifizierung keine Berücksichtigung mehr, da sie als Spätfolgen/Outcome und nicht als akutes Stadium gewertet werden.

Zwischenzeitlich erfolgte eine erneute Überarbeitung der Nomenklatur durch den internationalen Verband KDIGO (Kidney Disease Improving Global Outcomes) mit Zusammenführung der AKIN- und RIFLE-Kriterien zu einer einheitlichen Definition (KDIGO AKI Working Group, 2012). Grundlage für die Einteilung in drei Stadien bilden der Serumkreatininspiegel und die innerhalb eines definierten Zeitintervalls ausgeschiedene Urinmenge (Tab. 1).

Tab. 1: Stadieneinteilung der akuten Nierenschädigung nach KDIGO.

AKI-Stadium	Serumkreatinin	Diurese
1	1,5- bis 1,9-facher Anstieg ≤ 7 Tage oder Anstieg $\geq 0,3\text{mg/dl}$ innerhalb von 48 h	$< 0,5 \text{ ml/kg/h} > 6 \text{ h}$
2	2,0- bis 2,9-facher Kreatininanstieg	$< 0,5 \text{ ml/kg/h} > 12 \text{ h}$
3	≥ 3 -facher Kreatininanstieg oder Serum-Kreatinin $\geq 4 \text{ mg/dl}$ mit einem akuten Anstieg $\geq 0,5 \text{ mg/dl}$	$< 0,3 \text{ ml/kg/h} > 24 \text{ h}$ oder Anurie $\geq 12 \text{ h}$

Der Begriff „akutes Nierenversagen“ ist dabei immer mehr in den Hintergrund gerückt und wurde durch den Terminus „akute Nierenschädigung“ (AKI) ersetzt (KDIGO AKI Working Group 2012), da dieser nicht nur den Zustand des akuten Versagens der Nierenfunktion mit Dialysepflichtigkeit erfasst, sondern auch Nierenschädigungen einschließt, die noch nicht mit einem akuten Funktionsausfall der Niere einhergehen, aber bereits ein signifikant erhöhtes Letalitätsrisiko aufweisen (Haase et al., 2011). Es handelt sich daher um ein dynamisches Krankheitsbild mit einem breiten klinischen Spektrum.

1.1.2 Epidemiologie und klinischer Stellenwert

Die akute Nierenschädigung ist ein häufiges und ernstzunehmendes klinisches Krankheitsbild. Bei 8% (zu Beginn normale Nierenfunktion) bis 18% (zu Beginn bereits eingeschränkte Nierenfunktion) aller hospitalisierten Patienten liegt eine

akute Nierenschädigung vor (Shawney et al., 2017). Intensivmedizinisch betreute Patienten weisen gemäß den Definitionskriterien sogar eine Inzidenz von 26,7% bis zu 65,8% auf (Odutayo et al., 2012; Piccinni et al., 2011). Bereits eine geringe Erhöhung der Kreatininkonzentration geht mit einer deutlich erhöhten Mortalität einher (Lassnigg et al., 2008; Chertow et al., 2005). Zwar zeigen mehrere veröffentlichte Studien eine Erholungsrate (keine Dialysenotwendigkeit zum Entlassungszeitpunkt bzw. 30 bis 90 Tage nach Beginn des ANV) von 70% bis zu 90% (Bagshaw et al., 2009), jedoch Versterben etwa 50% der Intensivpatienten mit einem ANV und 10% der Überlebenden bleiben primär dialysepflichtig (Kindgen-Milles und Pannen, 2013).

Die ischämisch bedingte akute Nierenschädigung ist eine häufige Komplikation bei Organtransplantationen und umfangreichen operativen Eingriffen (Mahon und Shorten, 2006). Dabei ist Minderperfusion der Nieren in bis zu 50% der Fälle als Ursache für ein akutes Nierenversagen anzusehen (Star, 1998).

Die Inzidenz einer postoperativen Schädigung reicht von 18% bis 47% (Cramichael et al., 2003; Uchino et al., 2005). Vor allem herzchirurgische Patienten, die sich einer kardiopulmonalen Bypassoperation unterziehen, sind besonders häufig von einer akuten Nierenschädigung betroffen, da perioperativ multiple renale Stressoren kumulieren (Meersch et al., 2017).

Die akute Nierenschädigung stellt somit ein ernst zunehmendes Problem im klinischen Alltag dar. Trotz Erarbeitung einheitlicher Konsensuskriterien wird es in der klinischen Routine oft unterschätzt und aufgrund der limitierten verfügbaren diagnostischen Marker nicht frühzeitig genug erkannt. So können bereits minimale kurzfristige Anstiege des Serumkreatinins kurz- und langfristige Komplikationen wie Infektionen, chronisches Nierenversagen und kardiovaskuläre Erkrankungen zur Folge haben (Thakar, 2003; Go et al., 2004; Basile et al., 2016).

1.1.3 Ätiologie

Klinisch werden die möglichen Ursachen einer akuten Nierenschädigung je nach Schädigungsort in drei Kategorien eingeteilt: prärenal, renal (intrinsisch und tubulobstruktiv) und postrenal. Als gemeinsamer Endpunkt resultiert häufig ein

Ungleichgewicht zwischen Angebot und Nachfrage an oxygeniertem Blut und Nährstoffen durch eine eingeschränkte Mikrozirkulation einerseits und erhöhtem Energiebedarf durch zellulären Stress andererseits (Tögel und Westenfelder, 2014). Bei längerem Bestehen geht eine prä- oder postrenale Nierenschädigung in ein renales ANV über.

Das prärenale Nierenversagen ist gekennzeichnet durch eine intakte Funktion der renalen Glomeruli und Tubuli. Hauptursache für den Funktionsabfall/-ausfall der Niere mit Abnahme der GFR ist eine Minderperfusion durch Abnahme des mittleren arteriellen Blutdrucks. Die Nieren erhalten bis zu 25% des Herzzeitvolumens – somit hat jegliche Störung des zirkulierenden Blutvolumens durch Hypovolämie, eingeschränkte kardiale Funktion, Vasodilatation (Sepsis, Zirrhose) oder erhöhte Gefäßwiderstände (Anästhetika, hepatorenales Syndrom) auf Dauer negative Auswirkungen auf die renale Durchblutung.

Postrenale Schädigungen der Nieren ereignen sich durch Verlegung der harnableitenden Strukturen, von den Nierentubuli bis zur Harnröhre. Die Ursachen sind dabei vielfältig: erworbene Abflusshindernisse (Lithiasis, maligne Raumforderungen), angeborene Fehlbildungen, Medikamente (Anticholinergika) oder okkludierte Harnblasenkatheter. Durch den erhöhten intratubulären Druck kommt es dabei zu einem Abfall der GFR (Basile et al., 2012).

Das intrinsische Nierenversagen ist auf vielfältige Ursachen zurückzuführen. Durch eine akute Schädigung der Tubulusepithelzellen ischämischer (Hypovolämie, Thrombose mit Abfall Perfusionsdruck) oder toxischer Genese (Röntgenkontrastmittel, Chemotherapeutika) kann es zur akuten Tubulusnekrose kommen. Auch tubulointerstitielle Erkrankungen (NSAR induzierte Nephritis), Rhabdomyolyse und glomeruläre Erkrankungen (Glomerulonephritiden, Autoimmunerkrankungen) können Verursacher einer intrarenalen Nierenschädigung sein.

1.1.4 Pathophysiologie

Die Pathophysiologie der akuten Nierenschädigung ist von komplexer und multifaktorieller Genese. Kommt es zu einer Minderperfusion, so initiiert die

Aktivierung von Barorezeptoren eine Kaskade neuronaler und hormoneller Mechanismen (Sharfuddin, 2011). Die Aktivierung des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems bewirkt eine erhöhte Freisetzung des Vaskonstriktors Angiotensin II und führt somit zu einem erhöhten Gefäßwiderstand in der efferenten Arteriole der Niere (Blantz, 1987). Durch Anpassung des hydrostatischen Drucks innerhalb der Glomeruli kann somit die Nierenfunktion mit konstanter GFR aufrechterhalten werden. Diese autoregulatorischen Prozesse weisen jedoch einen schmalen Toleranzbereich auf. Unterhalb eines mittleren arteriellen Blutdrucks von 75-80mmHg kommt es zu einem plötzlichen Abfall der GFR und des renalen Blutflusses (Maddox et al., 2000). Eine Organprotektion durch niereneigene Kompensationsmechanismen funktioniert daher nur begrenzt, da ein Mangel mit Sauerstoff und Nährstoffen schnell zu Zellschäden und damit zur Organdysfunktion führt (Makis und Spanou, 2016).

Besonders vulnerabel ist das Nierenparenchym für Schädigungsprozesse, die auf eine eingeschränkte Perfusion (Ischämie) zurückzuführen sind und Vasokonstriktion, Endothelschäden sowie eine Induktion inflammatorischer Prozesse zur Folge haben (Bonventre, 2007). Intakte Endothelzellen beeinflussen entscheidend den Gefäßtonus, die Reagibilität glatter Muskelfasern und die Aktivierung von Leukozyten (Conger, 1997). Nimmt die effektive Durchblutung des Nierengewebes ab, so sind die Endothelzellen nicht länger in der Lage, eine ausreichende intrazelluläre ATP-Konzentration für die Aufrechterhaltung zellulärer Homöostaseprozesse bereitzustellen (Sharfuddin und Molitoris, 2011).

Die beschädigten Endothelzellen bewirken eine Vasokonstriktion der kleinen Arteriolen durch Freisetzung von Endothelin-1, Angiotensin II, Thromboxan A₂, Leukotrienen und Adenosin (Brooks, 1997; Kurata et al., 2005). Additiv wird die Vasokonstriktion durch eine verminderte Produktion vasodilatativer Substanzen (NO, Bradykinin) und eine gesteigerte Aktivierung von Leukozyten mit Adhäsion an die Endothelzellen und konsekutiver Freisetzung von Zytokinen verstärkt (Bonventre, 2004; Kwon et al., 2009;). Es resultiert eine ineffektive glomeruläre Filtration mit Abfall der GFR (Alejandro et al., 1995).

Generell können alle Abschnitte der Funktionseinheit Nephron von den negativen Auswirkungen einer Ischämie betroffen sein. Das letzte Segment des proximalen Tubulus (S3-Segment) und der dicke, aufsteigende Teil der Henle-Schleife sind im Bereich des äußeren Nierenmarks lokalisiert und besonders durch ischämische Ereignisse gefährdet, da bereits unter physiologischen Umständen eine grenzwertige Oxygenierung vorliegt und es postischämisch einer langen Erholungsphase bei nur langsam einsetzender Reperfusion bedarf (Brezis, 1995; Lieberthal und Nigam, 1998).

Besonders exponiert sind die Epithelzellen des proximalen Tubulus. Zum einen haben diese Zellen einen hohen metabolischen Umsatz zur Aufrechterhaltung des Transports von Ionen, zum anderen sind sie nur eingeschränkt zur anaeroben Glykolyse fähig (Sharfuddin, 2011).

Nach Abfall der ATP-Konzentration kommt es zu morphologischen Umbauprozessen mit Verlust des apikalen Bürstensaums, Freisetzung von Zelldetritus und Verlust intratubulärer Flüssigkeit in das Interstitium (Abb. 1). Ein intaktes Zytoskelett ist an der Regulation wichtiger zellulärer Prozesse beteiligt: Signaltransduktion, Endozytose, Zellpolarität, Bewegung von Zellorganellen und Stabilisierung der Zellmatrix (Molitoris, 2004). Die Auflösung zytoskelettaler Strukturen führt zur Umverteilung ganzer Membranproteine, wie der $\text{Na}^+\text{-K}^+$ -ATPase) nach apikal (Molitoris, 1997) und zur Auflösung intakter Zellverbände durch Zerstörung der Adhäsionsmoleküle und Tight-Junction-Proteine (Bonventre, 1996). Es kommt zu einer Abstoßung von Zelltrümmern und vitaler Zellen in das Tubuluslumen mit Okklusion der harnableitenden Tubuli, wodurch die bereits eingeschränkte Nierenfunktion zusätzlich aggraviert wird (Liu und Brakeman, 2008). Die Umverteilung der $\text{Na}^+\text{-K}^+$ -ATPase führt außerdem zu einem bidirektionalen Transport von Natrium und Wasser sowohl über die apikale als auch die basale Zellmembran mit einer erhöhten Natriumkonzentration im Tubuluslumen, wodurch das Transmembranpotential und das transepitheliale Potential zusammenbrechen. Der erhöhte Natriumgehalt bewirkt über die Makula densa eine Konstriktion der afferenten Arteriole und führt über eine Aktivierung der tubuloglomerulären Rückkopplung zu einem Abfall der GFR (Schnermann und Homer, 2003; Blantz et al., 2007).

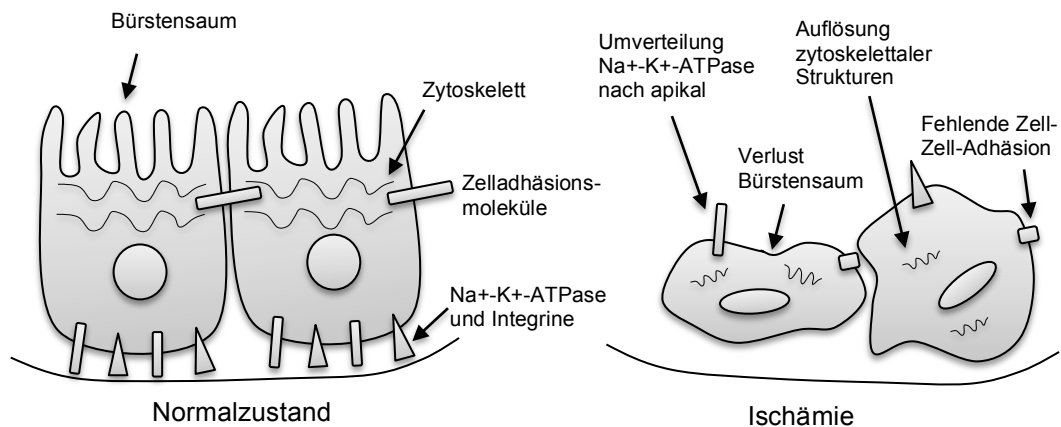


Abb. 1: Ischämie-induzierte Auswirkungen auf intra- und interzelluläre Strukturen der Tubulusepithelzellen der Niere.

Durch eine verstärkte Expression von Adhäsionsmolekülen auf der Zelloberfläche und Freisetzung chemotaktischer Substanzen geschädigter Endothelzellen des proximalen Tubulus kommt es zur Aktivierung und Infiltration von Leukozyten (Ysebaert et al., 2000). Unabhängig des Leukozyten-Subtyps führt die Induktion einer immunmodulatorischen Antwort über die Freisetzung von Chemokinen, Proteasen und reaktiver Sauerstoffspezies zu einer weiteren Schädigung der Endothel- und Organfunktion (Kelly und Molitoris, 2000).

Andererseits besitzen die renalen Tubulusepithelzellen ein erstaunliches Regenerationspotential. Postischämisch intakte Epithelzellen können sich dedifferenzieren, proliferieren und auch in denudierte Membranabschnitte des Tubulus migrieren (Sharfuddin, 2011). Nach Erreichen einer ausreichenden ATP-Konzentration werden zytoskelettale Strukturen und Zellpolarität wiederhergestellt und Membranproteine, wie die Na⁺-K⁺-ATPase, an die basolaterale Membran zurückversetzt (Spiegel et al., 1989).

Auch eine Beteiligung mesenchymaler und renaler Stammzellen rückt zunehmend in den Fokus. So konnten CD133-Progenitorzellen mit Potential zur Regeneration in der menschlichen Niere nachgewiesen werden (Gupta et al., 2006). Tierexperimentell konnten Stammzellen des Knochenmarks nach Ischämie-

/Reperfusion-Ereignis in der geschädigten Niere, nicht jedoch in der gesunden kontralateralen Niere dargestellt werden (Cantley, 2005).

Inwieweit diese Reparaturprozesse zu einer erfolgreichen Resitutio der Nierenfunktion beitragen, hängt maßgeblich von der Dauer und dem Ausmaß des nierenschädigenden Ereignisses ab.

1.1.5 Prävention und Risikostratifizierung

Risikofaktoren für die Entstehung einer akuten Nierenschädigung liegen sowohl prä- als auch intraoperativ vor. Vor allem komorbide Patienten mit chronischer Nierenschädigung, Diabetes mellitus, chronisch obstruktiver Lungenerkrankung und kardiovaskulären Begleiterkrankungen sind stark gefährdet (Biteker et al., 2014; Kim et al., 2014). Der Schweregrad der bereits präoperativ bestehenden Nierenschädigung ist dabei ausschlaggebend.

Intraoperativ stellt der kardiopulmonale Bypass vergesellschaftet mit SIRS (systemic inflammatory response syndrome), Koagulopathie und Emboliegefahr ein besonders hohes Risiko dar. In einer Metaanalyse konnte die Entwicklung einer akuten Nierenschädigung durch die Verwendung von off-pump-Verfahren um 43% gesenkt werden (Nigwekar et al., 2009).

Somit ist eine präoperative Risikostratifizierung entscheidend, um Hochrisiko-Patienten für die Entwicklung einer akuten Nierenschädigung zu detektieren und eine zeitgerechte präventive Strategie zu etablieren.

Wichtige präventive Maßnahmen sind die Aufrechterhaltung einer suffizienten Nierenperfusion mit Stabilisierung des mittleren arteriellen Blutdrucks. Die dadurch verbesserte Gewebeoxygenierung mit intakter glomerulärer Funktion beugen einer AKI vor (Redfors et al., 2009). Die KDIGO-Leitlinien empfehlen ein adäquates Volumenmanagement, die Vermeidung nephrotoxischer Substanzen, Monitoring von Serumkreatinin und Diurese, Normoglykämie und hämodynamisches Monitoring (KDIGO AKI Working Group, 2012). Als Volumenersatztherapie sollten vor allem isotone, kristalloide Lösungen verwendet werden (Yunos et al., 2012). Droht ein

intraabdominelle Kompartiment, sollte frühzeitig eine Messung des Blasendrucks etabliert werden (Cheatham et al., 2007).

Eine weitere Möglichkeit der Prävention stellt die IPC (*ischemic preconditioning*) dar – eine ischämische Präkonditionierung zur Verbesserung der Ischämietoleranz potentiell gefährdeter Organe (Herzmuskel, Niere). Der Effekt der ischämischen Prekonditionierung wurde erstmal 1986 beschrieben (Murry et al., 1986) und weist zudem protektive Effekte in entfernteren Organen und Geweben auf, die nicht unmittelbar den kurzen ischämischen Episoden unterliegen (Tapuria et al., 2008). Dazu wird präoperativ an der einer oberen Extremität eine Blutdruckmanschette 30mmHg suprasystolisch über 5 Minuten gestaut gefolgt von einer 5-minütigen Reperusionsphase; der Inflations-Deflations-Zyklus wird dabei 3 Mal wiederholt. Somit konnte das Auftreten eines akuten Nierenversagens nach kardiopulmonaler Bypassoperation von 52,5% auf 37,5% gesenkt werden; die Notwendigkeit einer Nierenersatztherapie von 15,8% auf 5,8% (Zarbock et al., 2015).

1.1.6 Therapie und Erholung

Progredientes, schweres Versagen die Nierenfunktion erfordert den Einsatz einer Nierenersatz-Therapie (intermittieren Hämodialyse, kontinuierlichen veno-venöse Hämofiltration). Die Auswahl des idealen Verfahrens zum bestmöglichen Zeitpunkt und dessen Dauer sind vielfach diskutiert. Die KDIGO-Leitlinien empfehlen eine RRT (renal replacement therapy) bei lebensbedrohlicher Hypervolämie oder metabolischen Entgleisungen (Azidose, Hyperkaliämie, Urämie) (KDIGO, 2012). Zwei große randomisierte Studien zeigten ein verbessertes Patientenoutcome nach frühzeitig etablierter Nierenersatztherapie im AKI-Stadium 2 nach KDIGO (Gaudry et al., 2016; Zarbock et al., 2016).

Bezüglich des Renal-Outcome zeigen sich erhebliche Unterschiede – je nach eingesetztem Dialyseverfahren. In der BEST-Kidney-Studie waren nur noch 5% der primär kontinuierlich dialysierten Patienten zum Entlassungszeitpunkt dialysepflichtig im Vergleich zu 17% unter Einsatz einer intermittierenden Hämodialyse (Uchino et al., 2007). Zudem besteht auch bei Patienten, die nur eine vorübergehende Einschränkung der renalen Funktion ohne Notwendigkeit einer RRT aufweisen, ein erhöhtes Sterblichkeitsrisiko (Lai et al., 2012).

1.2 Prostaglandin E₂ im akuten Nierenversagen

Prostaglandine (PG) sind wichtige Gewebshormone mit unterschiedlicher Zusammensetzung und Funktion und an einer Vielzahl physiologischer und pathophysiologischer Prozesse beteiligt. Die Synthese von Prostaglandinen erfolgt durch enzymatische Aufspaltung von Arachidonsäure in PGG₂ und PGH₂ mit weiterer Katalyse durch gewebespezifische Synthasen in bioaktive Prostaglandine (PGE₂, PGI₂, PGD₂, PGF_{2α}) und Thromboxan A₂ (Funk, 2001).

Bei intakter Nierenfunktion regulieren Prostaglandine die renale Hämodynamik, Renin-Freisetzung und Wasser-/Elektrolytkonzentration (Hao und Breyer, 2008). Unter pathophysiologischen Bedingungen (Inflammation, Schmerz, maligne Erkrankungen) kann es zu einer verstärkten Prostaglandin-Synthese kommen (Smith, 1992; Dubois et al., 1998).

Prostaglandin E₂ (PGE₂) wird in der Niere durch drei bisher bekannte PGE₂-Synthasen synthetisiert, wobei die mitochondriale PGE₂-Synthase die bedeutendste Rolle einnimmt und eng an die COX-1-/COX-2-Aktivität gekoppelt zu sein scheint (Park et al., 2006; Jania et al., 2009). PGE₂ und dessen Metabolite werden vor allem renal als Substrat der organischen Anionentransporter (Oat) ausgeschieden (Kimura et al., 2002). Die organischen Anionentransporter Oat1 und Oat3 vermitteln somit den geschwindigkeitsbestimmenden basolateralen Schritt bei der renalen Elimination von PGE₂. Sowohl nach akuter als auch chronischer Minderperfusion der Niere kommt es vor allem im Bereich des Nierenkortex zu einer vermehrten Synthese von PGE₂ (Tokuyama et al., 2002; Myers et al., 2003; Tokuyama et al., 2003). Auch inflammatorische Prozesse bewirken eine gesteigerte Synthese von PGE₂ und PG-Rezeptoren in der Niere (Hartner et al., 2000).

Eine erhöhte Konzentration an PGE₂ bewirkt eine Herunterregulation von Oat1 und Oat3 in den proximalen Tubuluszellen der Ratte nach bis zu 72-stündiger Expositionszeit und inhibiert damit seine eigene renale Elimination. (Sauvant et al., 2005; Schneider et al., 2007).

1.3 Cyclooxygenasen

Cyclooxygenasen (COX) sind die Schlüsselenzyme der Prostaglandinsynthese und katalysieren die ersten beiden Teilschritte bei der Aufspaltung von Arachidonsäure.

1.3.1 Die Isoformen COX-1 und COX-2

Es existieren zwei Isoformen: Cyclooxygenase-1 (COX-1) und Cyclooxygenase-2 (COX-2) mit ähnlicher molekularer Masse von 71kDa und 73 kDa, aber unterschiedlicher Konzentration und abweichenden Wirkmechanismen innerhalb des Nierenparenchyms (Nørregaard et al., 2015).

In der menschlichen Niere findet sich COX-1 vor allem im Bereich der Zellen von Glomerulum, Sammelrohr, Vasa recta und Interstitium (Komhoff et al., 1997; Sakurai et al., 2005) und wird unter physiologischen Bedingungen auf konstant hohem Level zur Aufrechterhaltung von Organfunktionen mit Regulation der Magensäureproduktion, Thrombozytenfunktion und der vaskulären Homöostase („housekeeping function“) exprimiert (Dubois et al., 1998). COX-2 findet sich in geringeren Konzentrationen im Bereich der Macula densa, Henle-Schleife und Podozyten, wird aber bei inflammatorischen oder ischämischen Prozessen verstärkt im gesamten Nierengewebe exprimiert und hochreguliert (Fitzpatrick und Soberman, 2001).

1.3.2 Die COX-Inhibitoren Indomethacin, SC560 und SC58125

Der nicht-selektive COX-Hemmer Indomethacin zählt zur Gruppe der nichtsteroidalen Antiphlogistika. Niedrig dosiert [1mg/kg Körpergewicht (KG)] verhindert er die Herunterregulation von Oat1 und Oat3 nach Ischämie und Reperfusion in der Niere der Ratte, was sich in einer verbesserten Sekretion organischer Anionen, wie PAH, und Ausscheidung endogener Anionen, wie PGE₂, widerspiegelt (Schneider et al., 2009). In vitro konnte der positive Effekt auf die Expression von Oat1 und Oat3 ebenfalls nachgewiesen werden (Sauvant et al., 2009, 2010).

Neben der Wiederherstellung von ionischen Transportprozessen bewirkt die Verabreichung von Indomethacin auch ein verbessertes renales Outcome mit Anstieg der GFR (Schneider et al., 2009). Dieser Effekt bestätigt Schlussfolgerungen vorangegangener Arbeiten, demzufolge eine Hemmung der PGE₂-Synthese positive Auswirkungen auf die Nierenfunktion nach ischämisch bedingtem akuten Nierenversagen (iANV) hat (Feitoza et al., 2002, 2005). COX-Metabolite fungieren somit als wichtige Mediatoren bei der Entstehung von Nierenschäden nach Organdysfunktion (Harris et al., 2011).

SC560 ist ein heterozyklischer COX-Hemmer und zeigt eine 700-fach höhere Selektivität für das Enzym COX-1 im Vergleich zu COX-2 (Smith et al., 1998). Der chemische Name lautet 5-(4-Chlorphenyl)-1-(4-methoxyphenyl)-3-(trifluoromethyl)-1H-pyrazolon mit der Summenformel C₁₇H₁₂ClF₃N₂O (Abb. 2). SC-560 hat einen stark lipophilen Charakter und ähnelt in seiner Bioverfügbarkeit von 5-15% der von Indomethacin (Masferrer et al., 1994, Teng et al., 2003).

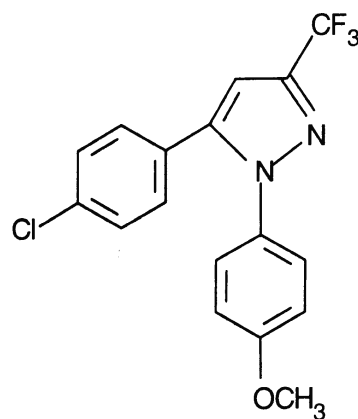


Abb. 2: Strukturformel des hoch selektiven COX-1-Hemmers SC560.

SC58125 ist wie SC560 ein heterozyklischer Cyclooxygenasehemmer. Die Substanz zeigt eine 150-fach höhere Wirksamkeit bei der Hemmung von COX-2 im Vergleich zu COX-1 (Anderson et al., 1996). Der chemische Name lautet 5-(4-Fluorophenyl)-1-(4-(methylsulfonylphenyl)-3-(trifluoromethyl)-1H-pyrazolon mit der Summenformel C₁₇H₁₂N₂SO₂F₄ (Abb. 3).

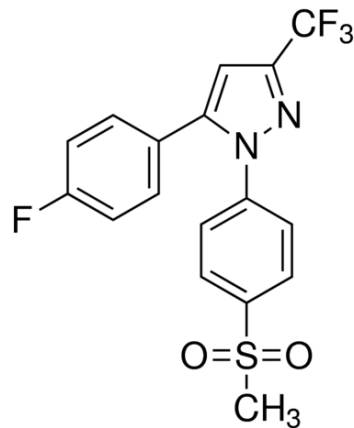


Abb. 3: Strukturformel des selektiven COX-2-Hemmers SC58125.

Klinische Relevanz besitzen die Cyclooxygenasen vor allem durch den Einsatz von COX-Hemmern wie NSAIDs (Non-steroidal anti-inflammatory drugs) oder selektiven COX-2-Inhibitoren (Valdecoxib, Celecoxib) zur Behandlung von Fieber, Schmerzen und entzündlichen Prozessen. Die nicht-selektiven NSAIDs hemmen beide Isoformen der COX und beeinflussen somit die PGE₂-Synthese (Vane, 1971). Ihr typisches Nebenwirkungsprofil umfasst neben Ulzerationen im Magen-Darm-Trakt die Beeinflussung der Blutgerinnung und Nierenfunktionsstörungen.

Mit Entdeckung der COX-2-Isoform und ihrer physiologischen Bedeutung mit Entwicklung einer neuen Wirkstoffklasse von selektiven COX-2-Inhibitoren sollten unter Beibehaltung der antiphlogistischen und analgetischen Effekte die unerwünschten Nebenwirkungen umgangen werden, was in der klinischen Verlaufsbeobachtung leider nicht bestätigt werden konnte (Harris, 2006; Bhala et al., 2013).

1.4 Transportsystem organischer Anionen der proximalen Tubuluszelle der Niere

Eine wichtige Rolle bei der Elimination und Ausscheidung von Xenobiotika und endogener metabolischer Stoffwechselprodukte kommt der renalen Clearance zu. Der proximale Tubulus der Niere verfügt über wichtige Resorptions- und Sekretionsprozesse an der apikalen und basolateralen Membran, die der

Ausscheidung harnpflichtiger Substanzen (Penicillin, Furosemid) sowie endogen produzierter Basen und Säuren (Harnsäure, PGE_2) dienen.

Dabei spielt das organische Anionentransportsystem der proximalen Tubulusepithelzelle der Niere eine zentrale Rolle bei der Elimination einer Vielzahl potentiell toxischer Substanzen (Bradford, 1976; Perri et al., 2003; Sauvant et al., 2003, 2006, 2009, 2010; Schneider et al., 2003; Van Moontford et al., 2003; Raff et al., 2005; Betz et al., 2012;). Erstmals beschrieben wurden die organischen Anionentransporter im Jahre 1997 (Sekine et al., 1997; Sweet et al., 1997). Bisher sind 10 Isoformen identifiziert (Burckhardt, 2012), darunter hOat1–8, hOat10 und der Urat-Transporter 1 (hURAT1).

Die Transporter Oat1 und Oat3 repräsentieren die klassischen Aufnahmetransporter für polyspezifische organischen Anionen der Niere (Dantzler und Wright, 2003; Sekine et al., 2006; Rizwan und Burckhardt, 2007) und sind Bestandteil des proximalen tubulären Transportsystems, welches organische Anionen sezerniert. Neben diesen an der basolateralen Membran lokalisierten Anionenaustauschern besteht dieses System aus den Transportproteinen hMRP2 und hMRP4 (multidrug resistance-associated proteins), die den Ausstrom organischer Anionen an der apikalen Membran regulieren. (Dantzler, 2002; El-Sheik et al., 2008; International Transporter Consortium, 2010).

Dabei fungieren die klassischen Transportproteine für organische Anionen (Oat1 und Oat3) als organischer Anionen-/Dicarboxylat-Austauscher, welche unter Verwendung eines auswärts gerichteten Dicarboxylat-Gradienten (α -Ketoglutarat²⁻, Succinat²⁻) organische Anionen aus der Blutbahn in das Zelllumen transportieren. Der Dicarboxylat-Gradient wird dabei durch einen einwärts gerichteten Na^+ -Einstrom gesteuert, welcher durch eine basolateral vorhandene Na^+ - K^+ -ATPase aufrechterhalten wird (Abb. 4). Die Aufnahme der organischen Anionen beschreibt somit einen tertiär aktiven Transportmechanismus (Fries, 1991; Wright et al., 2004). Der geschwindigkeitsbestimmende Schritt bei der Ausscheidung organischer Anionen in den proximalen Tubuluszellen der Niere wird somit durch die Anionentransporter Oat1 und Oat3 vermittelt.

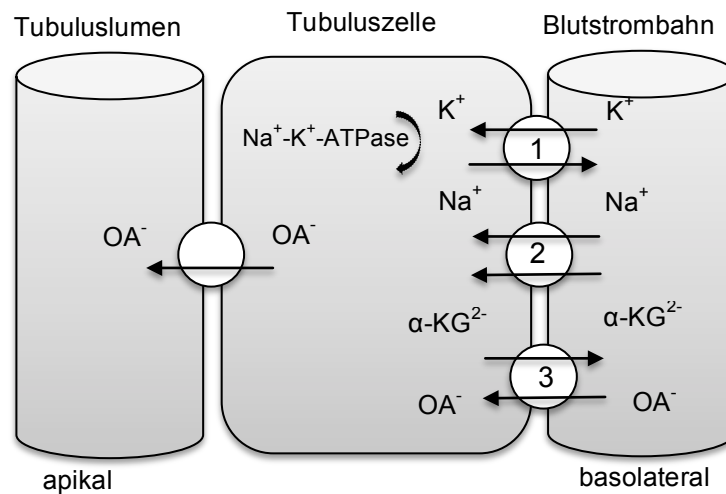


Abb. 4: Tertiärer Transportmechanismus organischer Anionen der proximalen Tubulusepithelzelle der Niere.

Schritt 1: $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$

Schritt 2: Na^+ /Dicarboxylat-Cotransporter

Schritt 3: OA^- /Dicarboxylat-Austauscher (Oat1/3)

OA^- organisches Anion; $\alpha\text{-KG}^{2-}$ α -Ketoglutarat $^{2-}$; K^+ Kalium; Na^+ Natrium

Zahlreiche Medikamente wie Antibiotika, antivirale Mittel, Diuretika, Antihypertensiva, Zytostatika, Statine und nichtsteroidale Antirheumatika dienen als Substrate von Oat1 und Oat3 (Rizwan und Burckhardt, 2007; Morrissey et al., 2012). Zusammenfassend wird deutlich, dass die Elimination toxischer endogener und exogener Substanzen maßgeblich von einer intakten Funktion der organischen Anionentransporter der proximalen Tubulusepithelzelle der Niere abhängt.

Die Aufrechterhaltung der Funktionalität der Transportproteine unterliegt dabei Schwankungen und stellt keinen konstanten Transportprozess dar. Einerseits muss eine entsprechende Affinität zum Substrat vorliegen, andererseits ist das Ausmaß der Transportkapazität vom Expressionslevel der organischen Anionentransporter abhängig. Kurz- und langfristige Regulationsmechanismen beeinflussen zusätzlich die Transportkapazität. Eine akute Modulation der Transportkapazität erfolgt durch die Proteinkinasen C und A (Dantzer, 2003; Terlouw, 2003). Langfristig scheint der Anionentransport durch Sexualhormone reguliert zu werden (Reyes et al., 1998),

vor allem durch Beeinflussung der Expressionsregulation von Oat1 und Oat3 (Buist et al., 2003; Ljubojevic et al., 2004). Auch eine Hyperurikämie induziert die reversible Herunterregulation von Oat1 und Oat3 (Habu et al., 2003, 2005) ebenso wie die tierexperimentell induzierte Obstruktion des Ureters (Villar et al., 2005). Ebenso kommt es während eines iANV zu einer verminderten Expression von Oat1 und Oat3 mit eingeschränkter Sekretion organischer Anionen (Schneider et al., 2007; Di Giusto et al., 2008).

1.5 Renaler Plasmafluss und PAH-Clearance

Das Transportsystem organischer Anionen extrahiert und sezerniert organische Anionen unter physiologischen Bedingungen nahezu vollständig. Para-Aminohippurat (PAH) dient als klassisches Substrat für die organischen Anionentransporter, da es während einer einzelnen Nierenpassage nahezu vollständig durch Filtration und Sekretion aus der Blutstrombahn entfernt wird und im venösen Blut der Niere kaum noch nachweisbar ist. Die Extraktion bezeichnet somit das Verhältnis der arteriovenösen Differenz einer Substanz zu ihrer Konzentration im arteriellen Blut (Wirz, 1954). Das PAH-Extraktionsverhältnis beträgt beim gesunden Menschen 0,9 (Warren et al., 1944, Battilana et al., 1991). Die verbleibenden 0,1 im arteriellen Blut werden unspezifischer Gewebepерfusion mit Umgehung der renalen Filtration zugeschrieben (Smith, 1938).

PAH wird frei filtriert und im Tubulussystem vollständig sezerniert und nicht rückresorbiert. Die PAH-Clearance ist somit ein geeigneter Parameter für die Bestimmung der Clearance und des renalen Plasmaflusses (RPF). Aus dem RPF lässt sich der renale Blutfluss (RBF) bestimmen. Bereits 1938 wurde die Clearance des modellhaften Substrats PAH als geeignete Messmethode für den RBF vorgeschlagen (Smith et al., 1938). Die PAH-Clearance eignet sich jedoch nur als valide Bestimmungsmethode für den RBF, wenn die Extraktion nahezu vollständig erfolgt und es während des experimentellen Ablaufs zu keiner Änderung im Extraktionsverhalten kommt (Bischoff et al., 2014).

Der Anteil des in den Tubulus sezernierten PAH-Anteils über die apikale Zellmembran wird durch den Begriff PAH-Nettosekretion (PNS) beschrieben. Die PNS ist ein geeignetes Maß zur quantitativen Erfassung der transepithelialen Sekretionsleistung der proximalen Tubuluszelle der Niere und sowohl vom apikalen Efflux als auch der basolateralen Aufnahme abhängig. (Abb. 5).

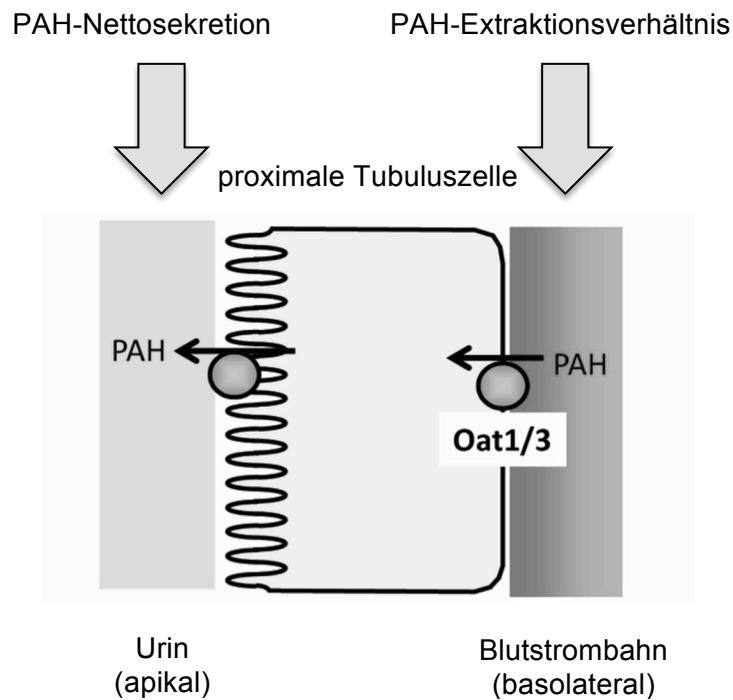


Abb. 5: PAH-Nettosekretion und PAH-Extraktionsverhältnis in der proximalen Tubulusepithelzelle der Niere.

2 Zielstellung

Das renale Transportsystem für organische Anionen spielt eine entscheidende Rolle bei der Elimination organischer Anionen (Prostaglandine; Paraaminohippurat) und anderer potentiell schädlicher Substanzen. Den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt vermitteln dabei die Transportproteine Oat1 und Oat3 im proximalen Tubulussystem.

Im Rahmen eines akuten ischämischen Nierenversagens (iANV) kommt es zu einer verminderten Expression der organischen Anionentransporter durch Prostaglandin E_2 . Dies konnte in vitro und in vivo (Rattenmodell) in vorangehenden Untersuchungen nachgewiesen werden.

Das vermehrte Vorliegen von Prostaglandin E_2 ist ein additiver Effekt aus Kumulation und vermehrter Synthese durch Cyclooxygenasen (COX-1/COX-2) im iANV. Es wurde gezeigt, dass die Applikation des unselektiven COX-Hemmers Indomethacin den hemmenden Effekt auf die Expression von Oat1/Oat3 aufhebt und einen positiven Effekt auf die Nierenfunktion hat. Zusätzlich finden sich in einem etablierten in vitro-Modell Hinweise, dass die Regulation von Oat1 und Oat3 sowie das renale Outcome im Wesentlichen durch die Cyclooxygenase-1 beeinflusst werden. Eine COX-2-Inhibitor zeigte im Zellmodell keinen Effekt.

Daraus lässt sich folgende Hypothese ableiten: Die Herunterregulierung von Oat1 und Oat3 im iANV ist auf die Bildung von Prostaglandin E_2 durch COX-1 zurückzuführen und führt zu einer verminderten Sekretion organischer Anionen. Es kommt zu einer verminderten Extraktion von PAH, einem wichtigen Parameter zur Bestimmung der PAH-Clearance und damit des renalen Plasmaflusses.

Es soll daher untersucht werden, ob eine selektive COX-Inhibition (durch SC560 als COX-1-Hemmer oder SC58125 als COX-2-Hemmer) vergleichbare positive Effekte auf die Expression/Regulation von Oat1/3 und das renale Outcome aufweist wie die nicht selektive Hemmung durch Indomethacin. Darüber hinaus ist zu hinterfragen, ob der verminderte renale Plasmafluss nach Ischämie tatsächlich Folge einer Minderperfusion oder einer verminderten Sekretion von PAH ist.

3 Material und Methoden

3.1 Allgemeines

Als Versuchstiere wurden weibliche Sprague-Dawley Ratten (Körpergewicht 200-250g, n = 84) von der Firma Charles River (Kisslegg, Deutschland) verwendet. Die Tierhaltung erfolgte bei konstanter Raumtemperatur, freiem Zugang zu Futter und Trinkwasser sowie geregelter 12-Stunden Tag-/Nacht-Rhythmus. Die fachgerechte Betreuung der Tiere und die experimentelle Vorgehensweise erfolgten in Übereinstimmung mit den Richtlinien für Versuchstiere entsprechend den Empfehlungen der FELASA (Federation of European Laboratory Animal Science Associations) und gemäß den Richtlinien der Ethikkommission des Bundeslandes Sachsen-Anhalt (Genehmigung 42502-2-1066MLU).

Nach einer Akklimatisierungsphase von mindestens 24 Stunden an die neue Umgebung erfolgte die Induktion des iANV durch eine bilaterale Unterbrechung der arteriellen renalen Perfusion über einen Zeitraum von 45 Minuten.

3.2 In vivo-Modell des ischämisch induzierten akuten Nierenversagens

Die Anästhesie der Versuchstiere wurde durch intraperitoneale Injektion von Xylazinhydrochlorid (10 mg/kg KG, Rompun® 2%, Bayer Vital GmbH, Leverkusen) und Ketamin (100 mg/kg KG, Ketavet®, Pharmacia & Upjohn GmbH, Erlangen) induziert. Nach Bestimmung des Körpergewichts und der Rasur beider Flanken wurde das Versuchstier in Rechtsseitenlage auf eine Wärmeplatte gelagert, um eine Aufrechterhaltung der Körpertemperatur von 37°C während der operativen Eingriffe zu gewährleisten. Dexpanthenol-Salbe (Bepanthen®, Hoffmann-La Roche AG, Grenzach-Wyhlen) wurde auf die Augen appliziert, um einer Austrocknung der Hornhaut vorzubeugen. Zusätzlich wurde das OP-Gebiet gründlich mittels Wischdesinfektion mit Povidon-Iod (Braunol®, B. Braun Melsungen AG, Melsungen) desinfiziert.

Nach Beurteilung und Sicherung einer adäquaten Narkosetiefe wurde circa 1cm subcostal eine 2cm lange Hautinzision parallel zum Rippenbogen mit Präparation der Haut- und Muskelschicht und anschließender Eröffnung der lateralen Bauchhöhle durchgeführt. Nach Einsetzen eines Wundsperrers zur verbesserten Sicht auf das OP-Feld erfolgte sukzessiv die Freilegung und Mobilisierung der Niere aus ihrer Fettkapsel. Nachfolgend wurden die hilusnahen Nierengefäße freigelegt und die Arteria renalis vorsichtig mittels stumpfer Präparation von der Vena renalis und dem Ureter separiert und gleichzeitig mit einem Faden umschlungen, um ein rasches Wiederauffinden der späteren Ligaturstelle zu gewährleisten. Nach provisorischem Verschließen der Wunde wurde das Versuchstier auf die kontralaterale Seite gelagert und das oben beschriebene Procedere analog der rechten Niere vollzogen. Nun wurden beide Arteriae renales in einem Abstand von nur wenigen Sekunden mit einem Mikro-Gefäßclip (Biomer, 8mm, Medicon Instrumente, Fa. Seidel, Buchendorf) ligiert und die Ischämiezeit mittels Timer auf 45 Minuten einprogrammiert.

Zur Prävention einer perioperativen Dehydratation durch Perspiratio erfolgte die intraperitoneale Applikation von 0,9% NaCl-Lösung (2,5 ml/kg KG) 15 Minuten nach Beginn der Klemmzeit. In den Versuchstiergruppen mit Medikamentenapplikation (SC560 oder SC58125) wurde die intraoperative Volumensubstitution durch die intraperitoneale Verabreichung der Medikamentenlösung 10 Minuten vor Beginn der Reperusionsphase ersetzt.

Nach Beendigung der Ischämiephase wurden die Gefäßklemmen entfernt und die Nieren wieder reperfundiert, welches am sofortigen Farbumschlag des Nierengewebes erkennbar war. Der Hautschnitt wurde mit einer fortlaufenden Naht der Muskelschicht und anschließender Einzelknopfnahnt der Cutis verschlossen.

Zur Sicherstellung der postoperativen Analgesie wurde dem Versuchstier Tramadolhydrochlorid (2mg/kg KG, Tramal®, Grünenthal GmbH, Aachen) und 0,9% NaCl (1ml/kg KG) zur postoperativen Flüssigkeitssubstitution subkutan injiziert.

Nach einer 24-stündigen Regenerationsphase wurde ein zweiter operativer Eingriff mit Messung der Inulin- und PAH-Clearance, Probengewinnung und Organentnahme durchgeführt.

3.3 Messung der Clearance, Probengewinnung und Organentnahme

Die Narkoseinduktion und präoperative Vorbereitung erfolgten analog zum Ersteingriff. Das Versuchstier wurde entsprechend dem operativen Vorgehen in Rückenlage fixiert. Nach Desinfektion der Zervikalregion mit Propan-2-ol (72 Vol. %, Cutasept® F, Bode Chemie, Hamburg) wurde eine Hautinzision im rechten lateralen Halsbereich durchgeführt und die Jugularvene freipräpariert. Das venöse Gefäß wurde mit einem Kunststoffkatheter kanüliert (Polyethylen, Außendurchmesser 1mm) und an eine mit Inulin-PAH-Lösung befüllte Perfusorspritze konnektiert. Die Inulin-PAH-Lösung wurde zuvor bereits aus FITC-Inulin (2mg/ml, Fluoreszein-Isothiozyanat markiertes Inulin, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim) und PAH (2mg/ml, para-Aminohippurat, Sigma-Aldrich Chemie GmbH) gelöst in NaCl-Lösung (0,9%) hergestellt. Die Induktion der Infusionsphase begann initial mit einer Bolusinjektion von 75 µl gefolgt von einer kontinuierlichen Infusionsrate von 0,12ml/min über einen Perfusor (B.Braun Melsungen AG, Deutschland) über einen Zeitraum von 50 Minuten.

Anschließend wurde zur Uringewinnung ein suprapubischer Längsschnitt durchgeführt, die Harnblase freigelegt und nach einer feinen Stichinzision mit einem Kunststoffkatheter katheterisiert. 30 Minuten nach Beginn der Infusionsphase (Gleichgewichtseinstellung) schloss sich eine 20-minütige Messphase an, in der bei konstanter Inulin-PAH-Infusionsrate gleichzeitig die Urinmenge in einem Reagenzglas gesammelt wurde.

Nach Beendigung der Messphase wurde der Blasenkatheter entfernt und die Urinprobe sofort gekühlt auf Eis gelagert. Zur weiteren Proben- und Organentnahme wurde das Abdomen der Ratte mittels Medianlaparotomie eröffnet und der Schnitt um eine Inzision subcostal beidseits nach lateral erweitert. Die linke Vena renalis wurde kannüliert, um Blutplasma direkt nach der Nierenpassage zu gewinnen (für die spätere Berechnung der korrigierten PAH-Clearance). Anschließend wurde die Aorta freigelegt, mit einer zuvor mit Heparinlösung gespülten Butterfly-Kanüle punktiert, das Blut in einem Reagenzglas gesammelt und ebenfalls umgehend auf Eis gelagert.

Nachfolgend wurden dem Versuchstier beide Nieren entnommen und nach makroskopischer Auftrennung in Nierenbeckenkelchsystem, Nierenkortex und Nierenmark in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C asserviert.

Die Blutproben wurde unmittelbar nach Beendigung des Eingriffs mittels Zentrifugation bei 3200rpm für 15 Minuten bei 15°C aufbereitet (Heraeus Sepatech Megafuge 1.0 R, Heraeus Instruments, Osterode) und das gewonnene Serum zusammen mit den Urinproben für die spätere Inulin- und PAH-Messung bei -20°C aufbewahrt.

3.4 Einteilung der Versuchstiergruppen

Die Versuchstiere wurden nach dem Zufallsprinzip in sieben verschiedene Gruppen eingeteilt. Der Begriff „medikamentöse Applikation“ oder „Medikamente“ betrifft im Folgenden nur die Gabe der Testsubstanzen SC560 oder SC58125. Alle weiteren Pharmazeutika wurden wie oben beschrieben verabreicht.

Kontrollgruppe:

Für die Bestimmung der Referenzwerte wurden die Versuchstiere der Kontrollgruppe nur dem zweiten operativen Eingriff ohne Medikamentenapplikation unterzogen. Anschließend erfolgte die Probengewinnung, Organentnahme und Berechnung der Clearance-Parameter.

Versuchstiergruppe „Ischämietiere“ (Abklemmen der Nierenarterien):

In dieser Versuchstiergruppe wurden alle unter 3.2 und 3.3 beschriebenen Maßnahmen ohne medikamentöse Applikation durchgeführt.

Versuchstiergruppe „Ischämietiere + Medikamentenapplikation“ (SC560 oder SC58125):

Das operative Vorgehen erfolgte analog der Versuchstiergruppe der Ischämietiere. Jedoch wurde die intraoperative intraperitoneale Flüssigkeitssubstitution mit 0,9%-iger NaCl-Lösung durch die intraperitoneale Applikation der Pharmazeutika SC560 oder SC58125 10 Minuten vor Beendigung der renalen Ischämiephase (Dauer 45

Minuten) mit einer Dosierung von 1mg/kg KG ersetzt, um einen rechtzeitigen Wirkungseintritt zum Reperfusionsebeginn zu gewährleisten und mögliche andere Wirkungen auf die Niere bereits während der Ischämiephase auszuschließen. Dieses Vorgehen wird im Folgenden als „postischämisch“ oder „nach erfolgter Ischämie“ bezeichnet.

Versuchstiergruppe „scheinoperierte Tiere“:

In dieser Versuchstiergruppe erfolgte das operative Vorgehen entsprechend der unter 3.2 und 3.3 erläuterten Vorgehensweise, jedoch wurde auf eine Ligatur der Aa. renales durch Gefäßklemmen und die Verabreichung von Medikamenten verzichtet.

Versuchstiergruppe „scheinoperierte Tiere + Medikamentenapplikation“ (SC560 oder SC58125):

Die durchgeführten Maßnahmen entsprachen denen der Versuchstiergruppe der scheinoperierten Tiere. Auch hier wurde die intraoperative intraperitoneale Flüssigkeitssubstitution mit 0,9%-iger NaCl-Lösung durch die Applikation der Pharmazeutika SC560 oder SC58125 10 Minuten vor Beendigung der Nicht-Ischämiephase (Dauer 45 Minuten) mit einer Dosierung von 1mg/kg KG ersetzt.

3.5 Messung der Fluorescein-Aufnahme in vitro

Die verwendete Zelllinie (OK-Zellen, Dr. Biber, Institut für Physiologie, Universität Zürich, Schweiz) wurde nach Erhalt im Brutschrank bei 37°C, 5% CO₂ und 95% Luftfeuchte in mit EBSS (Earle's balanced salt solution), Aminosäuren, 10% (vol/vol) FCS (Fetal Calf Serum, Biochrom KG, Berlin, Deutschland) und 26 mmol/L NaHCO₃ supplementiertem MEM (minimal essential medium) kultiviert. Für die Messung von Transportprozessen wurden die Zellen in permeablen Mikrotiterplatten (Porengröße 3µm; Falcon, Becton Dickinson Labware, Franklin Lakes) mit einer effektiven Wachstumsfläche von 4,3 cm²/Filter kultiviert. Alle Messungen erfolgten zwischen den Zellpassagen 60 und 100 bei einer Wachstumsdichte von 0,4x10⁶ cm⁻². Die Experimente wurden an Tag 10 nach Beginn der Kultivierung durchgeführt.

Für das In vitro-Ischämie-Reperfusionsmodell wurden die Zellen der Kontrollgruppe einer mit Bicarbonat-4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinethanesulfonsäure-Lösung (Bicarbonat-HEPES) gepufferten Ringerlösung (pH 7,4) zugeführt und mit 5mM Glucose supplementiert. Die Kultivierung erfolgte im Brutschrank bei 37°C und atmosphärischem Sauerstoffpartialdruck. Die Ischämiezellen wurden einer Bicarbonat-2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure (Bicarbonat-MES) gepufferten Ringerlösung (pH 6,6) ohne Zusatz von Glucose und einem Sauerstoffanteil unter 1% ausgesetzt. Die Puffervolumina betrugen jeweils 1ml. Die Zusammensetzung der Pufferlösungen ist nachfolgend zusammengefasst (Tab. 2). Nach 2-stündiger Exposition gegenüber nicht-ischämischen oder ischämischen Umgebungsbedingungen (pH 6,6, Aglykämie, O₂-Fraktion < 1%) wurden die Zellen unter standardisierten Wachstumsbedingungen (Simulation der Reperfusionsphase) kultiviert.

Tab. 2: Chemikalien für das Herstellen der Bicarbonat-HEPES und –MES-Puffer.

Chemikalie	Bicarbonat-HEPES	Bicarbonat-MES
NaHCO ₃	24.0 mM	4,5 mM
Na ₂ HPO ₄	0.8 mM	0,8 mM
NaH ₂ PO ₄	0.2 mM	0,2 mM
NaCl	86.5 mM	106 mM
KCl	5.4 mM	5,4 mM
CaCl ₂	1.2 mM	1,2 mM
MgCl ₂	0.8 mM	0,8 mM
HEPES	20 mM	20 mM
Titration pH-Wert	mit 1N NaOH auf pH 7,4	Mit 1N NaOH auf pH 6,6

Fluorescein ist ein klassisches Substrat von Oat1 und Oat3. Die zellulär aufgenommene Fluoresceinmenge stellt somit einen geeigneten Parameter zur Bestimmung der Aktivität und Transportkapazität der organischen Anionentransporter dar, welche den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt an der basolateralen Zellmembran bei der Aufnahme organischer Anionen vermitteln.

Der Transport organischer Anionen wurde durch Messung der Fluoresceinmenge nach 2-minütiger Expositionszeit detektiert. Hierfür wurden die Zellen 4x mit phosphatgepufferter Ringerlösung (PBS) gewaschen und anschließend mit 1 ml 0.1% Triton-X100 in 20 mM MOPS [3-(N-Morpholino)propansulfonsäure] lysiert und die Fluoreszenzintensität mit einem Photometer (Victor²; Wallac Instruments, Turku, Finnland) bestimmt. Die Fluoreszenzstärke wurde auf den Proteingehalt der Probe, quantifiziert anhand des Bicinchoninsäure-Assay (BCA, Pierce, USA), normalisiert.

3.6 Parameter der renalen Funktion

3.6.1 Bestimmung der glomerulären Filtrationsrate

Die GFR beschreibt das Gesamtvolumen an Primärharn, welches pro Zeiteinheit von den Glomeruli beider Nieren filtriert wird.

Die Berechnung der GFR erfolgt mit Hilfe folgender Gleichung:

$$\text{Inulin Clearance} = \frac{I_U * V_U}{I_A * t} \text{ [ml/min]}$$

I_U = Inulin-Konzentration im Urin [$\mu\text{g/ml}$]

V_U = Urinvolumen [ml]

I_A = Inulin-Konzentration im arteriellen Plasma [$\mu\text{g/ml}$]

t = Zeit [min]

Die Messung der Inulin-Konzentration im Urin und im Serum erfolgte durch eine Verdünnung der Proben mit einem Messpuffer im Verhältnis 1:500 und Kopplung an eine fluoreszierende Substanz (Fluorescein Isothiozyanat–Inulin, Sigma-Aldrich). Der Messpuffer wurde zuvor aus 1,15g TES (N-tris(hydroxymethyl)methyl-2-aminoethansulfonsäure) und 1,00g MES gelöst in 1 Liter destilliertem Wasser und mit 1N NaOH auf einen pH-Wert von 7,4 gepuffert hergestellt. Anschließend wurde die Fluoreszenzintensität der Probe photometrisch gemessen (VICTOR² 1420 multilabel counter, Wallace, USA; Anregungswellenlänge 480nm,

Emissionswellenlänge 520nm) und mit Hilfe einer verdünnten Standardreihe in die Inulinkonzentration in der entsprechenden Proben umgerechnet.

3.6.2 Bestimmung des renalen Plasmaflusses

Der RPF bezeichnet diejenige Menge an Blutplasma, welche innerhalb 1 Minute die Nieren durchströmt. Die PAH-Clearance zur Bestimmung des renalen Plasmflusses und wird wie folgt berechnet:

$$\text{PAH Clearance} = \text{RPF} = \frac{\text{PAH}_U * V_U}{\text{PAH}_P * t} \text{ [ml/min]}$$

V_U = Urinvolumen [ml]

PAH_U = PAH-Konzentration Urin [$\mu\text{g/ml}$]

t = Zeit [min]

PAH_P = PAH-Konzentration Blutplasma [$\mu\text{g/ml}$]

Um die PAH-Konzentration der Urin- und Serumproben bestimmen zu können, wurde die modifizierte Anthron-Methode angewandt. Dazu wurden die Proben zunächst mit 0,33M Perchlorsäure auf 1:101 (Urin) oder 1:11 (Serum) verdünnt und bei 12000 rpm für 10 Minuten zentrifugiert. Vom proteinfreien Überstand wurden 150 μl abpipettiert und nachfolgend je 80 μl der folgenden Reagenzien zugegeben: Natriumnitrit-Lösung 1%, Ammoniumamidosulfonat-Lösung 5%, HCl 32% und Kupplungsreagenz (N-(1-Naphtyl)ethylendiaminodihydrochlorid 0,1%. Die durch das Kupplungsreagenz induzierte Kupplungsreaktion wurde nach 10minütiger Inkubationszeit durch Hinzufügen von Ethanol absolut terminiert. Anschließend erfolgte die photospektrometrische Messung von PAH bei einer Wellenlänge von 550 nm (Dynatech Laboratories, Guernsey, CI, UK).

Parallel zur Probenaufbereitung wurde eine PAH-Eichreihe hergestellt, anhand derer bei direkter Proportionalität der PAH-Konzentration zur Intensität der Farbreaktion der PAH-Gehalt in den Urin- und Serumproben bestimmt wurde.

3.6.3 Bestimmung der korrigierten PAH-Clearance

Die Methode der PAH-Clearance zur Bestimmung des renalen Blutflusses ist jedoch nur valide, vorausgesetzt die Extraktion von PAH aus dem Blutplasma erfolgt nahezu vollständig und es liegen konstante Versuchsbedingungen vor.

Der Anteil des renal extrahierten PAHs lässt sich aus dem Verhältnis der arteriovenösen Differenz zur Konzentration von PAH im arteriellen Blut berechnen:

$$\text{EPAH (renale Extraktion PAH)} = \frac{(PAH_A - PAH_{RV})}{PAH_A} [\mu g/ml]$$

PAH_A = PAH-Konzentration im arteriellen Blutplasma [$\mu g/ml$]

PAH_{RV} = PAH-Konzentration im Blutplasma der Nierenvene [$\mu g/ml$]

Eine Extraktion nahe dem Wert 1 bedeutet somit eine fast vollständige Elimination der Substanz aus dem Blut der Nierenvene.

Bei beeinträchtigter Nierenfunktion kann auch die PAH-Extraktion eingeschränkt sein. Um die PAH-Clearance und damit den renalen Plasmafluss unter diesen Bedingungen so exakt wie möglich bestimmen zu können, wurde die PAH-Clearance um die renale Extraktion von PAH korrigiert. Die Berechnung erfolgt nach folgender Formel:

$$\text{korrigierte PAH Clearance} = \text{RPF} = \frac{[(PAH_U - PAH_{RV}) * V_U]}{[(PAH_A - PAH_{RV}) * t]} [ml/min]$$

PAH_U = PAH-Konzentration im Urin [$\mu g/ml$]

PAH_P = PAH-Konzentration im Blutplasma [$\mu g/ml$]

PAH_A = PAH-Konzentration im arteriellen Blutplasma [$\mu g/ml$]

PAH_{RV} = PAH-Konzentration im Blutplasma der Nierenvene [$\mu g/ml$]

V_U = Urinvolumen [ml]

t = Zeit [min]

3.7 Western Blot

3.7.1 Aufbereitung der Proben

Die bei -80°C gelagerten Gewebeproben des Nierenkortex wurden zu Beginn zerkleinert, mit einem Lyse-Puffer [25 mmol/l Tris-HCl, 7mmol/l reduziertem Glutathion, 0,5 mmol/l Ethylendiamintetraacetat (EDTA), 0,2 mmol/l Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF), 1µmol/l Leupeptin, 1µmol/l Pepstatin, 1µmol/l Trans-Epoxy succinyl-L-Leucylamidobutan und 1mg/ml Trypsininhibitor] versetzt und anschließend mit einem Ultraschall-Homogenisator (UW70, Bandelin Electronic, Berlin, Deutschland) weiter bearbeitet. Der totale Proteingehalt der Proben wurde unter Zuhilfenahme der Bradford-Methode bestimmt (Bradford 1976). Die Proben wurden je nach Proteingehalt mit Probenpuffer versetzt (200 mmol/l Tris-Puffer, SDS 6%, Glycerol 15% und Bromthymolblau), 5 Minuten bei 95°C denaturiert und anschließend bei -20°C gelagert.

2.7.2 Probenanalyse

Für die weitere Probenanalyse wurden die Proteinproben mit einem Proteingehalt von 25µg zunächst in einem 5%-igen Sammelgel ((500µl TrisHCl [pH 6,8], 250µl Acylamid/Bisacrylamid 40%, 1250µl dd H₂O, 18µl SDS 10%, 7,5µl APS 10% und 2,5µl TEMED) fokussiert und anschließend in einem 10%-igen Trenngel (1000µl TrisHCl [pH 8,8], 1000µl Acylamid/Bisacrylamid 40%, 2000µl dd H₂O, 45µl SDS 10%, 15µl APS 10% und 5µl TEMED) bei 125 Volt und 80mA über zwei Stunden ihrer Molekülgröße nach aufgetrennt. Der Laufpuffer setzte sich zusammen aus aus 15,1g Tris Base, 94g Glycin und 50ml SDS 10% auf 1000ml H₂O.

Nach Abschluss der Gelelektrophorese wurden die Proteinproben in einem mit Blottingpuffer (5,8 g Tris Base, 94g Glycin und 0,38g SDS 10% auf 1000ml H₂O)gefülltem Tankblot (Firma Biorad) auf eine Nitrocellulose-Membran (Amersham Pharmacia Biotech, England) transferiert. Um unspezifische Antikörperreaktionen zu vermeiden und den spezifischen Nachweis von Antigenen

zu sichern, wurden freie Bindungsstellen der Membran mit Hilfe einer Blotto-Lösung {3%iges fettfreies Milchpulver in Tris-Puffer-Lösung-TBS (20 mmol/l Tris, 150 mmol/l NaCl, pH 7,5) und 0,1% Tween (Tween 20 pure, Serva, Deutschland) für 1 Stunde bei Raumtemperatur blockiert. Die Membran wurde 3x für je 5 Minuten in einem Waschpuffer (TBS-Tween-Puffer: 20 mmol/l Trisbase, 137 mmol/l NaCl, Tween 20 0,05%) gewaschen und anschließend mit einem Primärantikörper (anti-Oat1 verdünnt 1:1000 bzw. anti-Oat3 verdünnt 1:3000, Tab. 3) in entsprechender Konzentration über Nacht bei 4°C inkubiert.

Tab. 3: Verwendete Antikörper im Western Blot.

Antikörper Name Firma	Konzentration	2. AK	Konzentration
Oat1 GTX47147 Gene Tex (Irvine, Kalifornien, USA)	1 :1000	Rabbit-IgG DAKO (Hamburg, Deutschland)	1:2000
Oat3 SAB 2102179 Sigma (St. Louis, Montana, USA)	1:3000	Rabbit-IgG DAKO (Hamburg, Deutschland)	1:2000

Nach weiteren Waschvorgängen zur Entfernung unspezifischer gebundener Antikörpermoleküle wurde ein geeigneter Enzym-gekoppelter Sekundärantikörper (HRP – horseradish peroxidase) verdünnt 1:2000 hinzugefügt und die Lösung für 45 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach erneutem, mehrmaligem Waschen erfolgte der Proteinnachweis indirekt über eine durch die Peroxidase katalysierte Chemolumineszenzreaktion unter Verwendung des Chemolumineszenz-Kits ECL Plus gemäß den Herstellerangaben (Amersham Pharmacia Biotech, Little Chalfont, UK) erfolgen. Der gewonnene Chemolumineszenz-Film wurde densitometrisch mit Hilfe der Quantity One Software (Bio-Rad Laboratories, Philadelphia, USA) ausgewertet.

3.8 Real-Time PCR

Für die Bestimmung der mRNA-Menge von iNOS, MCP-1, Oat1 und Oat3 wurden Gewebeproben aus dem Nierenkortex entnommen und einer PCR zugeführt. Für die RNA-Extraktion wurde das Qiagen RNA Isolation Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) entsprechend den Anweisungen des Herstellers verwendet. Die RNA wurde mit Hilfe des iScript cDNA synthesis kit (Biorad, CA, USA) entsprechend den Herstellerangaben in cDNA umgeschrieben. Die Durchführung der Real-Time-PCR erfolgte anhand des iQ SYBR-Green Supermix RT-PCR system protocol (Biorad, CA, USA) mit initialer Denaturierung bei 95°C für 3 Minuten. Die anschließende PCR-Amplifikation wurde in 45 Zyklen zu je 15 Sekunden bei 94°C, 30 Sekunden bei 55°C und 60 Sekunden bei 72°C durchgeführt. Der abschließende Elongationsschritt erfolgte für 10 Minuten bei 72°C.

Die induzierbare NO-Synthase wurde entsprechend der Methode von Canuelo et al. bestimmt (Canuelo et al., 2007).

Als Primer für iNOS wurde 5'-GCA GGT TGA GGA TTA CTT CTT CCA-3' (sense) und 5'-GCC CTT TTT TGC TCC ATA GGA AA-3' (antisense) verwendet, resultierend in einem 94 Basenpaar langen RT-PCR-Produkt.

MCP-1 wurde mit Hilfe der von Lu et al. beschriebenen Methodik bestimmt (Lu et al., 2009) mit 5'-CCC AGA AAC CAG CCA AC-3' (sense) und 5'-TGC TGC TGG TGA TTC TCT-3' (antisense) als Primer und einem 223 Basenpaar langen RT-PCR-Produkt.

Für die organischen Anionentransporter wurden folgende Primer verwendet: 5'-AGA GTC ACA GAG CCC TGC AT-3' (sense) und 5'-GCC CAG GCT GTA GAC ATA GC-3' (antisense) für Oat1 mit einem RT-PCR-Produkt aus 402 Basenpaaren und 5'-TCC TGG TGG GTA CCA GAG TC-3' (sense) und 5'-CTG CAT TTC TGA AGG CAC AA-3' (antisense) für Oat3 mit einem RT-PCR-Produkt aus 468 Basenpaaren. Das RT-PCR für β -Aktin mit einer Länge von 129 Basenpaaren wurde mit Hilfe der Primer 5'-TCT ACA ATG AGC TGC GTT TG-3' (sense) und 5'-TAC ATG GCT GGG GTG TTG AA-3' (antisense) gewonnen.

Die korrekte Größe der PCR-Produkte wurde mit Hilfe einer Agarosegel-Elektrophorese und der Schmelzpunktanalyse überprüft. Die Quantifizierung

erfolgte mittels der $\Delta\Delta C$ -Methode, wobei β -Aktin als Referenzgen verwendet und die Expression in den Kontrollproben dem Wert 1 gleichgesetzt wurde.

3.9 Caspase-3-Aktivitätsassay

Die Aktivität der Caspase 3 wurde mit Hilfe eines Fluoreszenz-Kits (Clontech Laboratories, Heidelberg, Deutschland) mit geringer Modifizierung der Vorgehensweise seitens des Herstellers bestimmt. Die dem tiefen Kortex und der äußeren Medulla der Rattenniere entnommenen Proben wurden zunächst mit auf 4°C gekühlten PBS gewaschen und im nächsten Schritt mit 150 μ l Zelllyse-Puffer für 10 Minuten auf Eis gelagert inkubiert. Nach Homogenisierung und erneuter Inkubation für 20 Minuten wurde das Lysat bei 16.000 g für 10 Minuten bei 4°C zentrifugiert. Vom Überstand wurden 60 μ l mit 50 μ mol/l DEVD-AFC (Asp-Glu-Val-Asp-7-amino-4-trifluoromethylcoumarine) versetzt und für 60 Minuten bei 37°C inkubiert. Durch spezifische Spaltung des DEVD-AFC-Substrats wird der Fluoreszenzfarbstoff AFC (7-amino-4-trifluoromethylcoumarine) freigesetzt, welcher anschließend mit einer Anregungswellenlänge von 400nm und einer Emissionswellenlänge von 505nm photometrisch mit einem Multiplattenreader (Victor²; Wallac, Turku, Finnland) gemessen wurde. Die quantitative Bestimmung des Abspaltungsproduktes AFC erfolgte schließlich unter Verwendung einer Eichkurve bekannter AFC-Konzentrationen.

Als Negativkontrolle wurden aus derselben Nierenregion entnommene Gewebeprobe zusätzlich zum oben genannten Prozedere mit dem Caspase-3-Inhibitor zDEVD-CHO versetzt. Unter diesen Versuchsbedingungen konnte keine Caspase-3-Aktivität detektiert werden.

Die Quantifizierung der Proteinmenge wurde mit dem Bicinchoninsäure-Assay (Pierce, Rockford, USA) mit Rinderalbumin als Referenzstandard durchgeführt.

3.10 Statistik

Die als n-Wert im Text oder in den Abbildungen angegebenen Zahlen spiegeln die Anzahl der Versuchstiere, die Anzahl der Gewebeproben für bestimmte Verfahren (RT-PCR, Western Blot) wider. Die Ergebnisse sind als Mittelwert $\pm$ Standardabweichung angegeben. Werte von $p < 0,05$ vor werden als statistisch signifikant definiert und sind in den Grafiken mit einem Stern oder einer Raute markiert.

Die statistische Signifikanz wurde mit Hilfe des Zweistichproben-t-Tests nach Student für zwei unabhängige Stichproben mit gleicher Standardabweichung ermittelt. Statistische Berechnungen erfolgten mit dem Programm Microsoft Excel 2007 (Microsoft Corporation, Deutschland). Zur Varianzanalyse wurde der ANOVA Test durchgeführt (Sigma Stat 3.5, Systat Software AG, Erkrath).

4 Ergebnisse

4.1 Der Effekt selektiver COX-Hemmer auf die Aufnahme organischer Anionen in die proximale Tubuluszelle der Niere (OK-Zelllinie)

Zunächst wurden die Auswirkungen selektiver COX-Hemmer auf die Aufnahme des prototypischen organischen Anions Fluorescein in proximale Tubulusepithelzellen von OK-Zellen unter ischämischen und nicht-ischämischen Wachstumsbedingungen untersucht.

OK-Zellen sind Nierenepithelzellen der Beutelratte (Opposum Kidney) und verfügen ebenso wie humane renale Tubulusepithelzellen über ein spezifisches Transportsystem für organische Anionen. In Zellkultur bleiben ihre Teilungsfähigkeit und physiologischen Transporteigenschaften erhalten und sie eignen sich daher experimentell als Vertreter für humane Tubulusepithelzellen. OK-Zellen sind hinreichend dafür bekannt, an der basolateralen Membran der Tubuluszelle den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt beim Transport organischer Anionen zu vermitteln (Sauvant et al., 2003).

Als COX-Inhibitoren kamen SC560 als COX-1-Hemmer und SC58125 als COX-2-Hemmer zum Einsatz.

Die OK-Zellen wurden für 2 Stunden unter Standardbedingungen (Kontrolle) oder ischämischen Bedingungen (Ischämie-/Reperfusions-Modell, I/R-Modell) inkubiert. Die Applikation von SC560 oder SC58125 (jeweils 1 μ M) erfolgte sofort nach stattgehabter Ischämie oder Nicht-Ischämie mit anschließender Kultivierung unter Standardbedingungen für 48 Stunden als Simulation der renalen Reperfusionsphase.

Abbildung 7 zeigt eine signifikante Abnahme der Fluorescein-Aufnahme in OK-Zellen unter ischämischen Wachstumsbedingungen im Vergleich zu den unter Standardbedingungen kultivierten Kontrollzellen. Die Applikation des hoch selektiven COX-1-Hemmers SC560 konnte die im I/R-Modell eingeschränkte Fluorescein-Aufnahme in OK-Zellen nahezu vollständig aufheben. In den Kontrollzellen konnte dagegen kein Effekt von SC560 nachgewiesen werden.

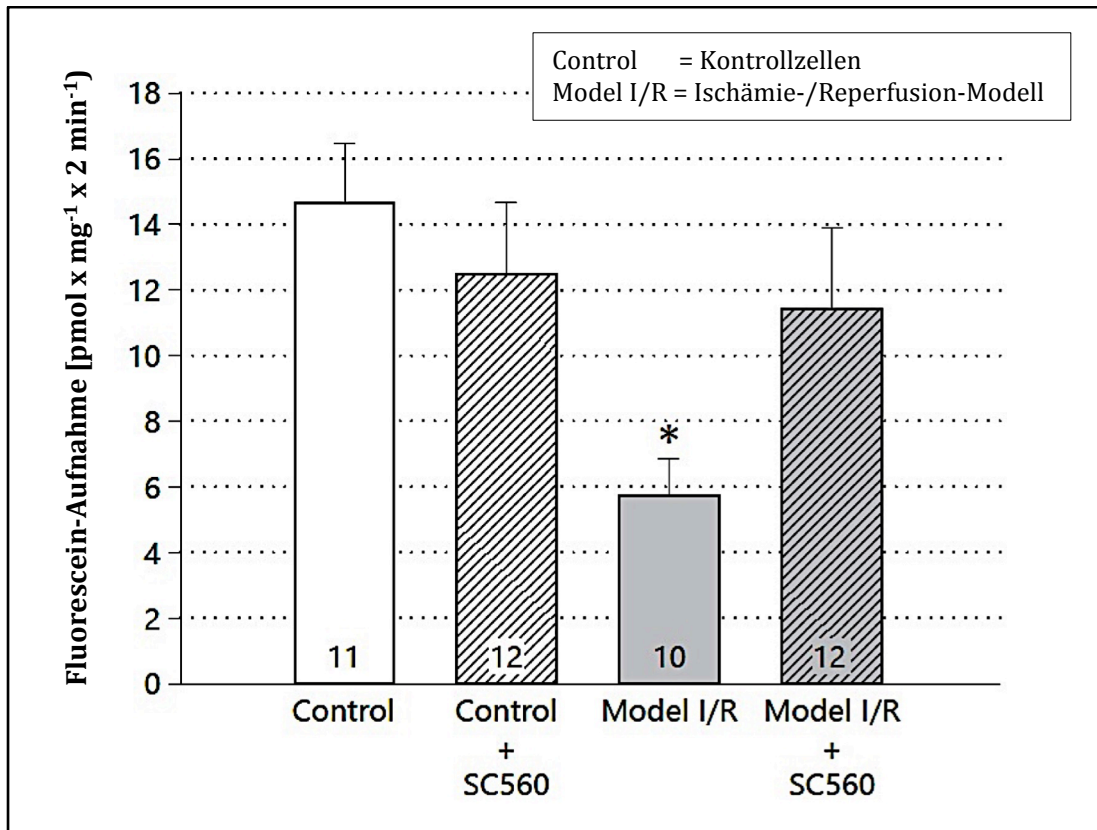


Abb. 7: Effekt von SC560 auf die basolaterale Fluorescein-Aufnahme unter nicht-ischämischen und ischämischen Bedingungen in OK-Zellen. Angabe der Fluoresceinmenge in pmol/mg Zellprotein und Aufnahmezeit.

* zeigt einen statistisch signifikanten Unterschied zu den unter Standardbedingungen kultivierten Kontrollzellen.

Auch in Abbildung 8 kommt es im I/R-Modell zu einer deutlichen Abnahme der zellulären Fluorescein-Aufnahme. Die Applikation des selektiven COX-2-Hemmers SC58125 führte zu keinem Anstieg der intrazellulär gemessenen Fluoresceinmenge. Auch in den Kontrollzellen kam es zu keinem nachweisebaren Effekt.

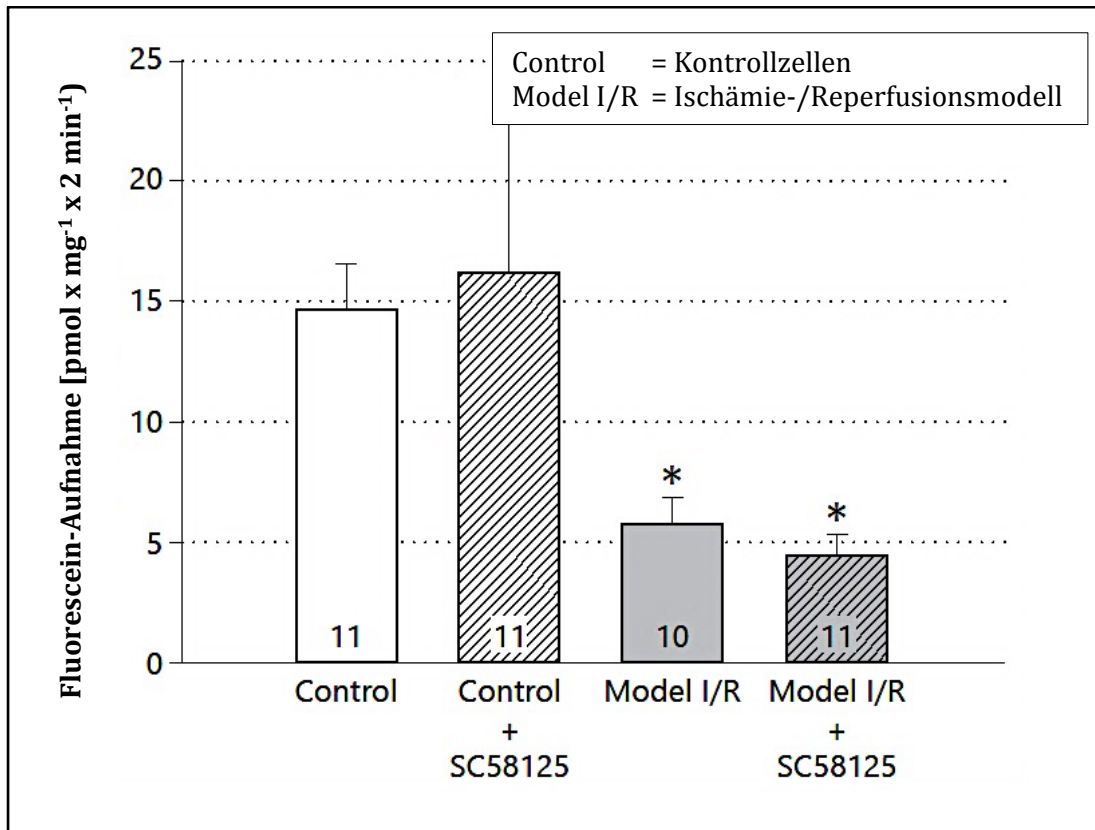


Abb. 8: Effekt von SC58125 auf die basolaterale Aufnahme organischer Anionen in proximale tubuläre OK Zellen. Angabe der zellulär aufgenommenen Fluoresceinmenge in pmol/mg Zellprotein und Aufnahmezeit.

* zeigt einen statistisch signifikanten Unterschied zu den unter Standardbedingungen kultivierten Kontrollzellen.

Die positive Beeinflussung der zellulären Fluoresceinaufnahme in OK-Zellen durch den selektiven COX-1-Inhibitor SC560 gibt einen ersten Hinweis darauf, dass die durch Ischämie induzierte Herunterregulation des organischen Anionentransports vor allem durch COX-1 als vermittelt wird.

Zur weiteren Verifizierung der Arbeitshypothese wurde in den folgenden Untersuchungen der Effekt von SC560 und SC58125 auf Expressionsebene von Oat1 und Oat3 durch Quantifizierung der mRNA- und Proteinmenge analysiert.

4.2 Der Effekt selektiver COX-Inhibitoren auf die Expression der organischen Anionentransporter Oat1 und Oat3

In vorangegangenen Arbeiten konnte bereits nachgewiesen werden, dass es im Rahmen eines ischämisch bedingten akuten Nierenversagens zu einer vermehrten Synthese von Prostaglandin E₂ und konsekutiv zu einer verminderten Expression von Oat1 und Oat3 in den proximalen renalen Tubuluszellen kommt (Tokuyama et al., 2003; Schneider et al., 2006, 2007). Weiterführend konnte gezeigt werden, dass der nicht-selektive COX-Hemmer Indomethacin die Herunterregulation von Oat1 und Oat3 nach ischämisch bedingtem akuten Nierenversagen sowohl in der Zellkultur als auch in vivo verhindert (Sauvant et al., 2007; Schneider et al., 2009). Somit ergab sich die Fragestellung, ob dieser Effekt durch die Verwendung der selektiven COX-Hemmer SC-560 (COX-1) oder SC58125 (COX-2) weiter differenziert und somit nähere Rückschlüsse auf die Expression von Oat1 und Oat3 auf mRNA- und Proteinebene während eines akuten Perfusionsschadens der Niere gezogen werden können.

Die Analyse der exprimierten Oat1- und Oat3-mRNA erfolgte mittels Real-Time-PCR; die Untersuchung der synthetisierten Proteinmenge von Oat1 und Oat3 basierte auf dem Western Blot-Verfahren. Die Proben wurden dem tiefen renalen Kortex entnommen.

Bei Betrachtung der Abb. 9 und 10 fällt zunächst ein signifikanter Unterschied in der Expression von Oat1 und Oat3 zwischen scheinoperierten und I/R-behandelten Tieren auf. Das heißt, während eines iANV kommt zu einer Mindereexpression der organischen Anionentransporter, was bereits von Schneider et al. 2007 festgestellt wurde (Schneider et al., 2007). Wurden nun selektive COX-Hemmer verwendet, so zeigten weder SC560 (COX-1, 1 mg/kg KG) noch SC58125 (COX-2, 1 mg/kg KG) eine signifikante Beeinflussung der mRNA-Menge von Oat1 und Oat3 nach 24-stündigem Reperfusionsintervall in scheinoperierten Tieren. Betrachtet man dagegen die I/R-behandelten Versuchstiere, so wurde die Ischämie-bedingte Herunterregulation der mRNA sowohl von Oat1 als auch von Oat3 durch SC560 teilweise aufgehoben, wohingegen SC58125 keinerlei Beeinflussung der mRNA-Menge zeigte.

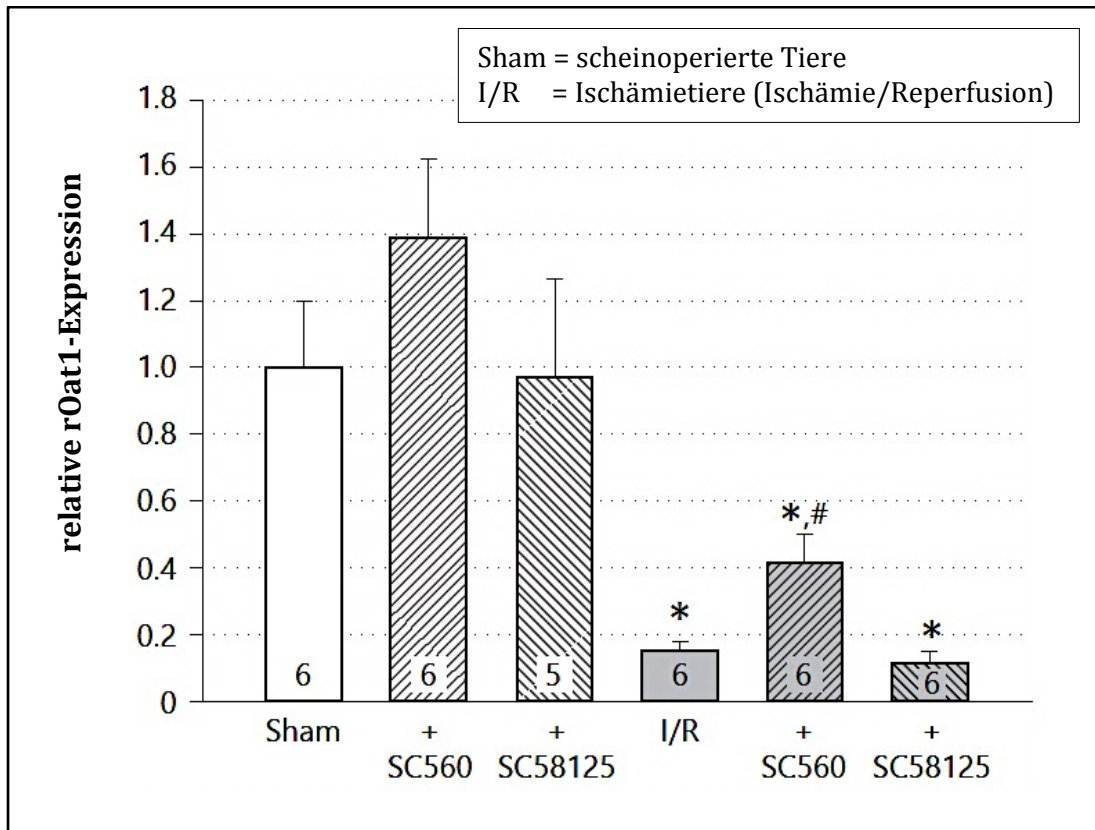


Abb. 9: Auswirkungen der selektiven COX-Hemmer SC560 und SC58125 auf die mRNA-Menge von Oat1 im renalen Kortex von Sprague-Dawley Ratten nach iANV und 24-stündiger Reperfusionsphase.

Der mRNA-Gehalt der Kontrollgruppe wurde dem Wert 1 gleichgesetzt.

* statistisch signifikanter Unterschied zu scheinputerierten Tieren.

zeigt einen statistisch signifikanten Unterschied zu Ischämietieren ohne Medikamentenapplikation.

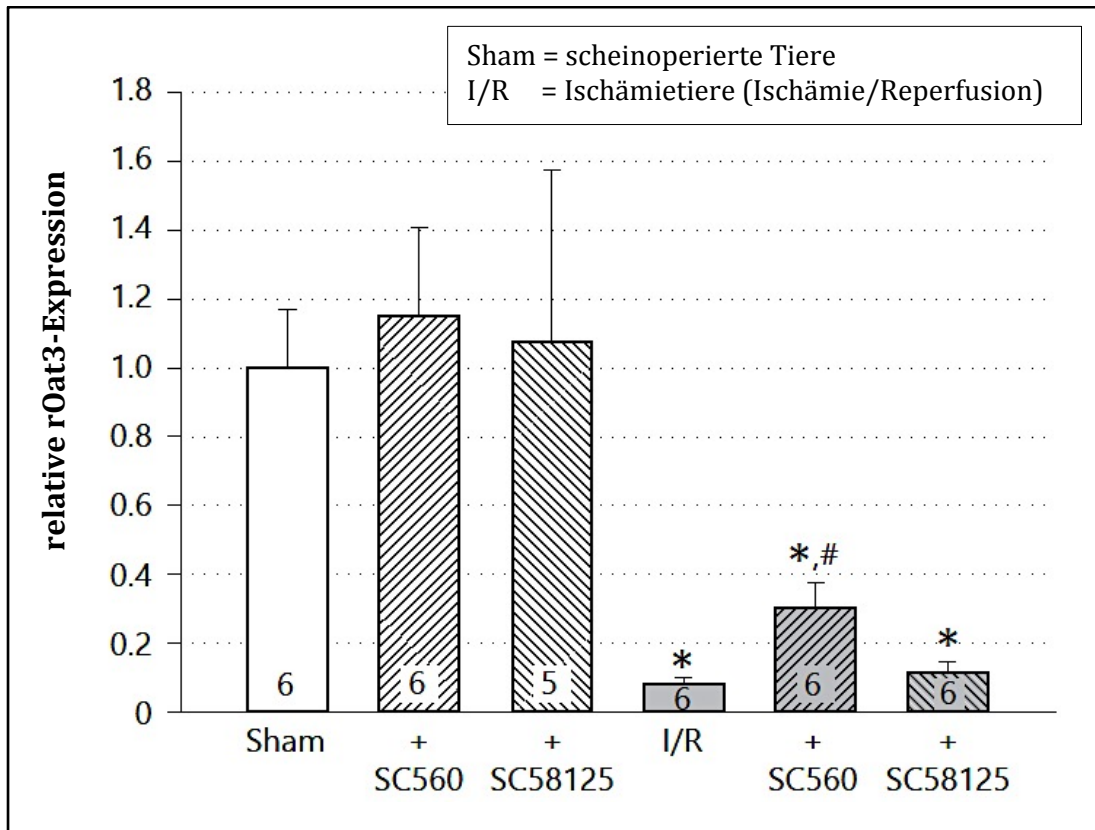


Abb. 10: Auswirkungen von SC560 und SC58125 auf die mRNA-Menge von Oat3 im renalen Kortex von Sprague-Dawley Ratten nach iANV und 24-stündiger Reperfusionsphase.

Der mRNA-Gehalt der Kontrollgruppe wurde dem Wert 1 gleichgesetzt.

* statistisch signifikanter Unterschied zu scheinputierten Tieren.

zeigt einen statistisch signifikanten Unterschied zu Ischämietieren ohne Medikamentenapplikation.

Ein ähnliches Ergebnis zeigte sich auf Ebene der Proteinexpression (Abb. 11 und 12). Auch hier kommt es zu einer verminderten Expression von Oat1 und Oat3 während eines iANV mit Nachweis eines positiven Effektes durch Anwendung von SC560. Auffällig ist der ausgeprägte Effekt des selektiven COX-1-Hemmers SC560: Die Synthese beider Proteine (Oat1 und Oat3) in der Ischämiegruppe unterschied sich nach der Applikation von SC560 nicht mehr von der Kontrollgruppe, die ebenfalls SC560 erhalten hatte. Das heißt, eine selektive Hemmung der COX-1 hat die Ischämie-bedingte Minderexpression der organischen Anionentransporter auf Proteinebene aufgehoben.

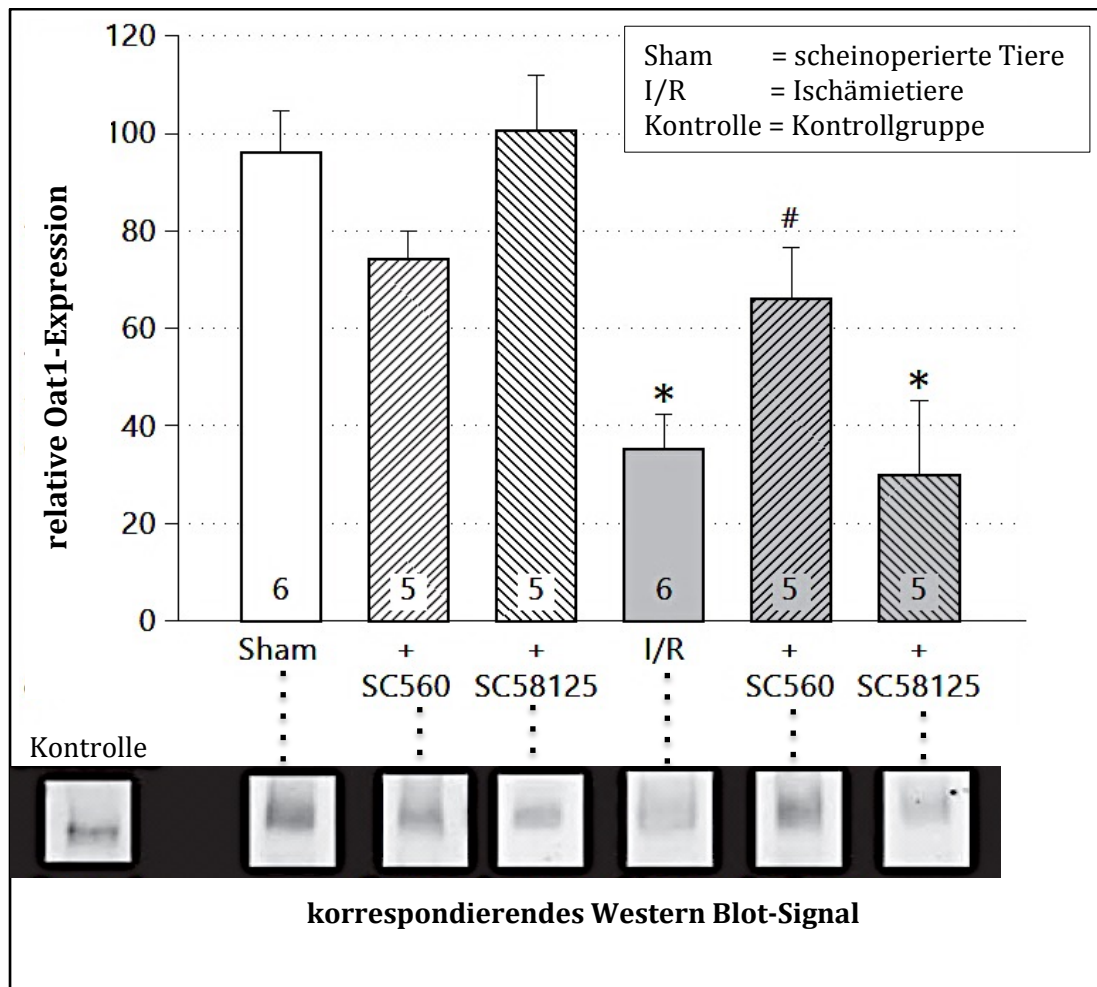


Abb. 11: Effekt von SC560 oder SC58125 auf die relative Expression von Oat1 in der Nierenrinde von Sprague-Dawley Ratten 24 Stunden nach renaler Ischämie. Die Expressionsmenge von Oat1 wurde als prozentuales Verhältnis zur Kontrollgruppe (100%) dargestellt.

Der Antikörper gegen Oat1 zeigte eine Bande bei 57kDa.

Das Western Blot Signal von Oat1 wurde gegen das Signal von β -Aktin normalisiert.

* statistisch signifikanter Unterschied zu scheinputierten Tieren.

statistisch signifikanter Unterschied zu Ischämietieren ohne Medikamentenapplikation.

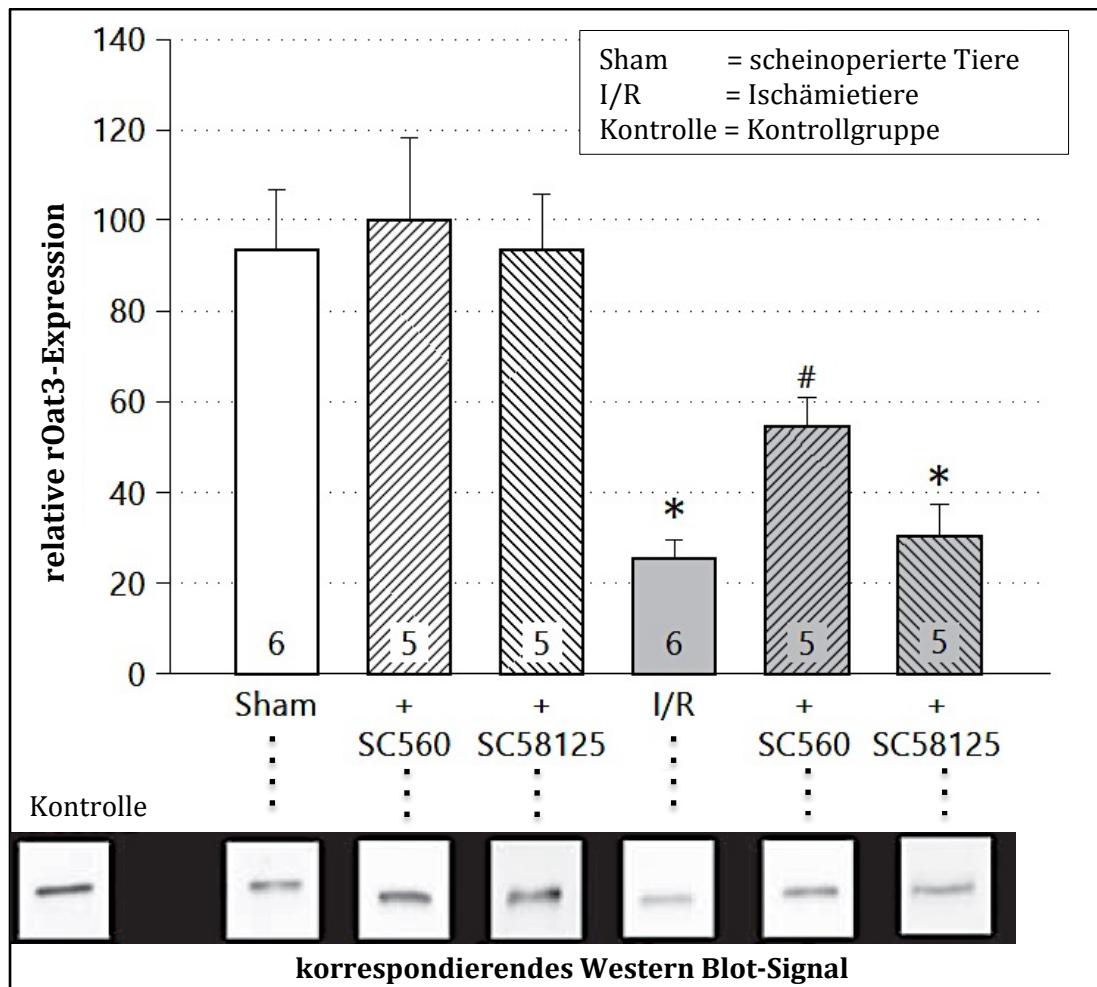


Abb. 12: Effekt von 1mg/kg SC560 oder SC58125 auf die relative Expression von Oat3 in der Nierenrinde von Sprague-Dawley Ratten 24 Stunden nach renaler Ischämie. Die Expressionsmenge von Oat3 wurde als prozentuales Verhältnis zur Kontrollgruppe (100%) dargestellt.

Der Antikörper gegen Oat1 zeigte eine Bande bei 65kDa.

Das Western Blot Signal von Oat3 wurde gegen das Signal von β -Aktin normalisiert.

* statistisch signifikanter Unterschied zu scheinoperierten Tieren.

statistisch signifikanter Unterschied zu Ischämietieren ohne Medikamentenapplikation.

4.3 Der Effekt selektiver COX-Inhibitoren auf das PAH-Extraktionsverhältnis

Die organischen Anionentransporter Oat1 und Oat3 vermitteln den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt bei der Sekretion organischer Anionen an der basolateralen Membran der proximalen Tubuluszelle der Niere. Um den Effekt von SC560 bzw. SC58125 auf den Transport organischer Anionen messen zu können, wurde die Extraktionsrate von PAH, als Prototyp einer organischen Säure, 24 Stunden nach dem Ischämieereignis untersucht. Die PAH-Extraktion spiegelt die basolaterale Aufnahme von PAH in die proximale Tubuluszelle aus dem Blutplasma wider und dient somit als Indikator für die Transport- und Funktionsleistung der organischen Anionentransporter und die Exkretionsleistung der proximalen Tubuluszelle der Niere.

In unserem etablierten Tiermodell konnten wir bereits nachweisen, dass nach I/R-Ereignis die Herunterregulierung von rOat1 und rOat3 mit einer verminderten PAH-Extraktion vergesellschaftet ist (Bischoff et al., 2014).

Aus Abbildung 13 geht hervor, dass es im Rahmen eines iANV zu einer signifikanten Abnahme der PAH-Extraktionsrate kommt. Durch die Verabreichung von SC560 (1mg/kg KG) wurde dieser Effekt im Vergleich zur Gruppe der scheinoperierten Versuchstiere, die ebenfalls SC560 erhalten haben, partiell aufgehoben. Übereinstimmend mit der Datenlage über die Expression von rOat1 und rOat3 konnte für SC58125, appliziert nach renaler Minderperfusion, kein Effekt nachgewiesen werden.

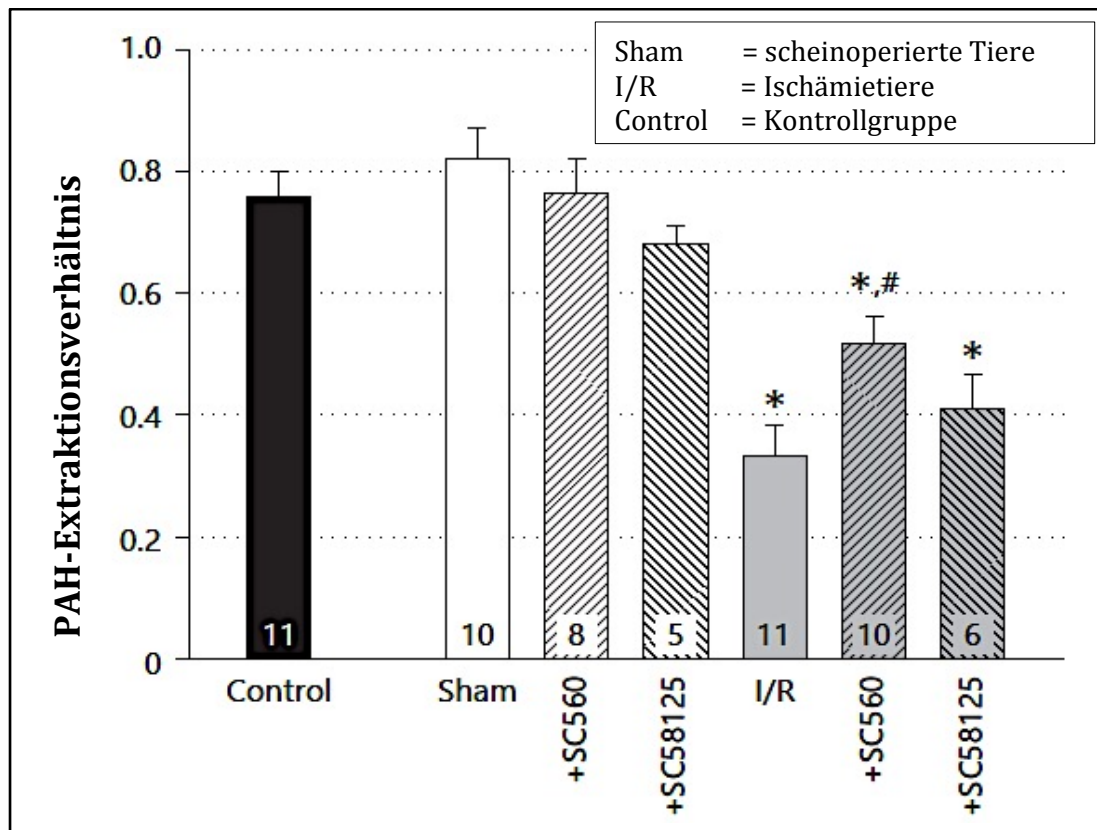


Abb. 13: Der Effekt von 1mg/kg SC560 oder SC58125 auf das Extraktionsverhältnis von PAH in Sprague-Dawley-Ratten 24 Stunden nach renaler Minderperfusion.

* statistisch signifikanter Unterschied zu scheinputierten Tieren.

Statistisch signifikanter Unterschied zu unbehandelten Ischämietieren.

Zusammenfassend zeigt sich somit eine gute Korrelation zwischen der Expression der organischen Anionentransporter Oat1 und Oat3 und dem dazugehörigen Funktionsverhalten der PAH-Extraktionsrate während eines ischämisch bedingten akuten Nierenversagens. Der selektive COX-1-Hemmer SC560 konnte die Minderexpression von Oat1 und Oat3 aufheben und führte zu einem Anstieg der PAH-Extraktionsrate während eines iANV. Um weitere Rückschlüsse auf die gesamte Nierenfunktion ziehen zu können, wurden im Folgenden die Nierenfunktionsparameter RPF und GFR berechnet.

4.4 Der Effekt selektiver COX-Inhibitoren auf Funktionsparameter der Niere

Die PAH-Clearance ist eine valide Messmethode zur Bestimmung des renalen Plasmaflusses, vorausgesetzt die PAH-Extraktion erfolgt nahezu vollständig und die Extraktion unterliegt keinen Veränderungen während des experimentellen Ablaufs. Um eine vergleichbare und verlässliche Messung der PAH-Clearance und damit der renalen Durchblutung zu erhalten, korrigierten wir die PAH-Clearance um die PAH-Extraktionsrate. Daraus ergibt sich eine authentische Messung für die Bestimmung des renalen Plasmaflusses auch bei den Versuchstieren, die ein I/R-Ereignis (beschrieben nach Bischoff et al., 2014) durchlaufen haben und dadurch variable PAH-Extraktionsraten aufzeigen könnten.

Wie in Abbildung 14 dargestellt, kam es während eines iANV zu einem starken Abfall der renalen Perfusion. Durch Applikation von SC560 kam es postischämisch zu einem signifikanten Anstieg der renalen Durchblutung, wohingegen SC58125 ohne nachweisbare Wirkung blieb. Tatsächlich konnte die Verwendung von SC560 den renalen Plasmafluss in der Versuchstiergruppe der Ischämietiere fast verdoppeln.

In der Gruppe der scheinoperierten Versuchstiere führten sowohl SC560 als auch SC58125 zu einer Steigerung des renalen Plasmaflusses. Da die PAH-Extraktionsrate in scheinoperierten Tieren unter Medikamentenapplikation ohne nachweisbaren Effekt blieb, scheint der renale Plasmafluss demzufolge durch die selektive Hemmung von COX-1 bzw. COX-2 beeinflusst zu sein.

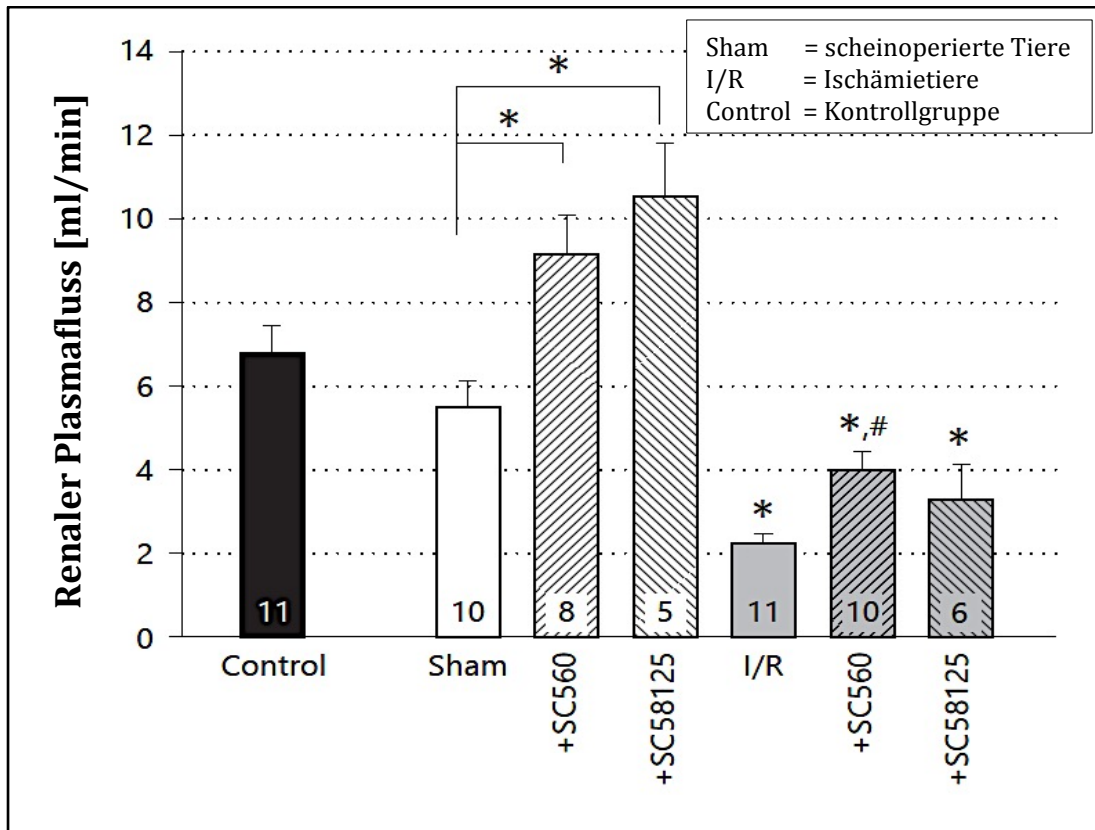


Abb. 14: Der Effekt von 1mg/kg SC560 oder SC58125 auf die Perfusion der Niere in Sprague-Dawley-Ratten 24 Stunden nach renaler Minderperfusion.

* Statistisch signifikanter Unterschied zu scheinooperierten Tieren ohne Medikamentenapplikation.

Statistisch signifikanter Unterschied zu Ischämietieren ohne Medikamentenapplikation.

Ähnliche Ergebnisse zeigten sich auch bei Bestimmung der GFR. In bisherigen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass Indomethacin den Abfall der GFR 24 Stunden nach Ischämieereignis verringert und zu mehr als einer Verdopplung der renalen Filtration im Vergleich zu unbehandelten I/R-Versuchstieren führt (Schneider et al., 2009).

Bei Anwendung selektiver Inhibitoren von COX-Isoformen, stellte sich folgendes Ergebnis dar (Abb. 15): Unter SC58125 (1mg/kg KG; COX-2-Hemmer) kam es zu keiner Beeinflussung der GFR nach 24-stündiger Reperfusionsphase nach Minderdurchblutung der Niere. Dagegen kam es unter Anwendung von SC560 (1mg/kg KG; COX-1-Hemmer) zu einem fast 5-fachen Anstieg der GFR im

Vergleich zu den gemessenen Werten bei scheinputierten Tieren, die ebenfalls SC560 erhalten haben. Zwischen unbehandelten scheinputierten Versuchstieren und scheinputierten Versuchstieren mit Medikamentenapplikation konnte kein signifikanter Unterschied nachgewiesen werden.

Somit hat SC560 im Versuchstiermodell der Ratte einen bedeutenden Effekt auf die renale Filtration nach renaler Ischämie, SC58125 hingegen nicht.

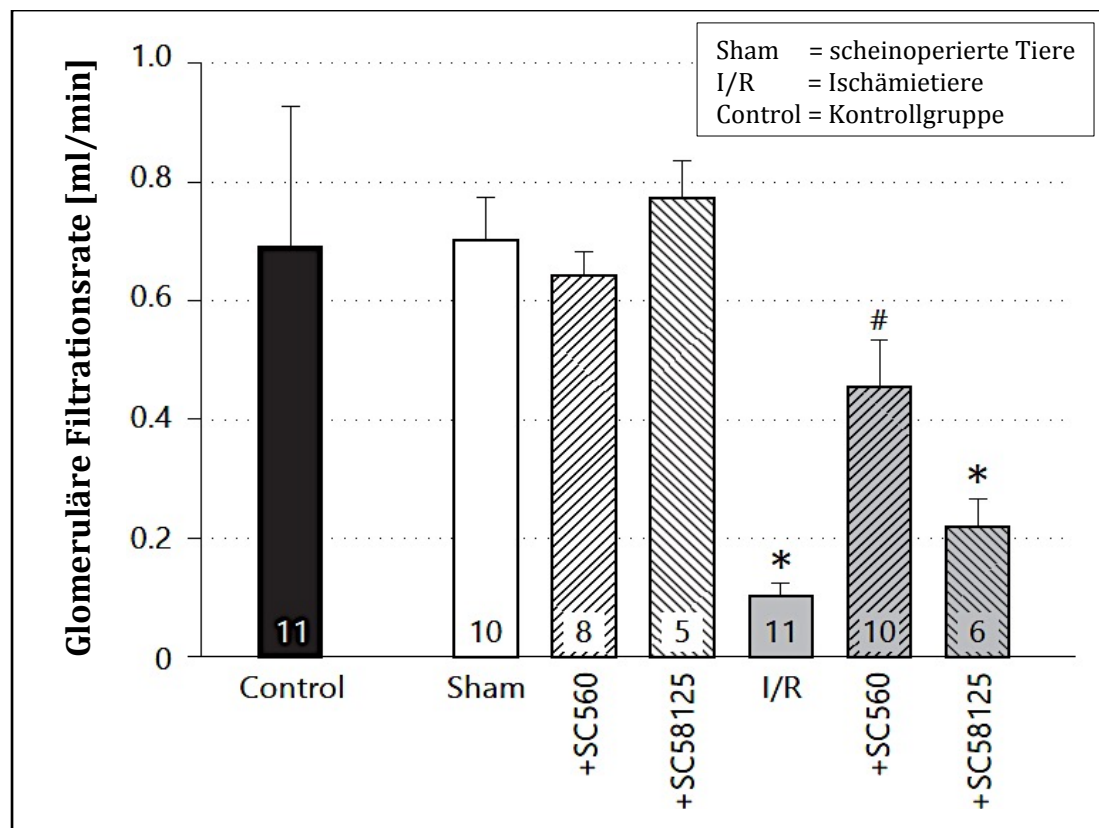


Abb. 15: Der Effekt von 1mg/kg SC560 oder SC58125 auf die Inulin-Clearance der Niere in Sprague-Dawley-Ratten 24 Stunden nach renaler Minderperfusion.

* statistisch signifikanter Unterschied zu scheinputierten Tieren.

statistisch signifikanter Unterschied zu Ischämietieren ohne Medikamentenapplikation.

4.5 Der Effekt selektiver COX-Inhibitoren auf Parameter der renalen Dysfunktion

Während eines ischämisch bedingten akuten Nierenversagens kommt es zu Apoptoseprozessen innerhalb des Nierenkortex, überwiegend im Bereich der Epithelzellen (Sheridan et al., 2000). Die gravierendsten Schädigungen finden sich dabei im Bereich des tiefen Nierenkortex und der äußeren Markgrenze. Um das Ausmaß der Nierenschädigung zu detektieren wurde im Zelllysats der Schädigungszone die Caspase-3-Aktivität als Apoptose-Marker untersucht. Bei der Aktivierung der Caspase 3 während des Apoptosevorgangs handelt es sich um einen irreversiblen Prozess. Somit ist ihre Aktivitätsmessung ein geeignetes Maß für die Beurteilung von Zellschädigungen durch Apoptose.

Wie aus Abbildung 16 hervorgeht, kam es während der Minderperfusion der Niere zu einer relevanten Zunahme der Caspase-3-Aktivität. Weder eine Scheinbehandlung, noch die Applikation von SC560 bzw. SC58125 beeinflusste die Caspase-3-Aktivität. In Versuchstieren mit iANV trat eine erhöhte Aktivität der Caspase-3 auf. Dieser Effekt konnte durch SC560 und SC58125 vollständig aufgehoben werden. Somit verhindern sowohl COX-1-Hemmer (SC560) als auch COX-2-Hemmer eine Apoptose im Bereich des Nierenkortex nach ischämisch bedingtem akuten Nierenversagen .

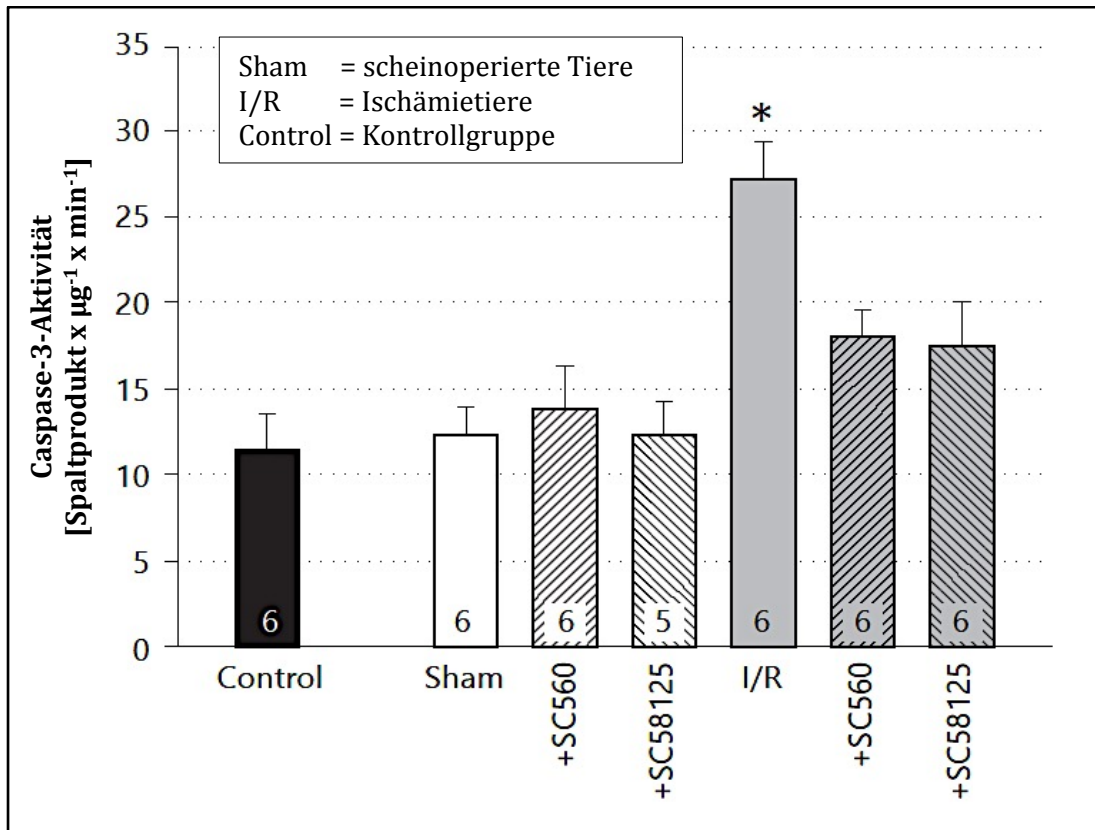


Abb. 16: Effekt von 1mg/kg SC560 und SC58125 auf die Caspase-3-Aktivität als Apoptosemarker im Nierenkortex 24 Stunden nach renaler Ischämie.

* Statistisch signifikanter Unterschied zu Ischämietieren mit Medikamentenapplikation und scheinoperierten Tieren (behandelt/unbehandelt).

Die induzierbare NO-Synthase (iNOS) und ihre Hochregulierung im Rahmen eines iANV kennzeichnet einen weiteren wichtigen Marker zur Beurteilung einer Nierenschädigung auf Zellebene (Guan et al., 2006). Um dies zu verifizieren, wurde iNOS auf mRNA-Ebene im Bereich des tiefen Kortex und der äußeren Medulla untersucht (Abb. 17).

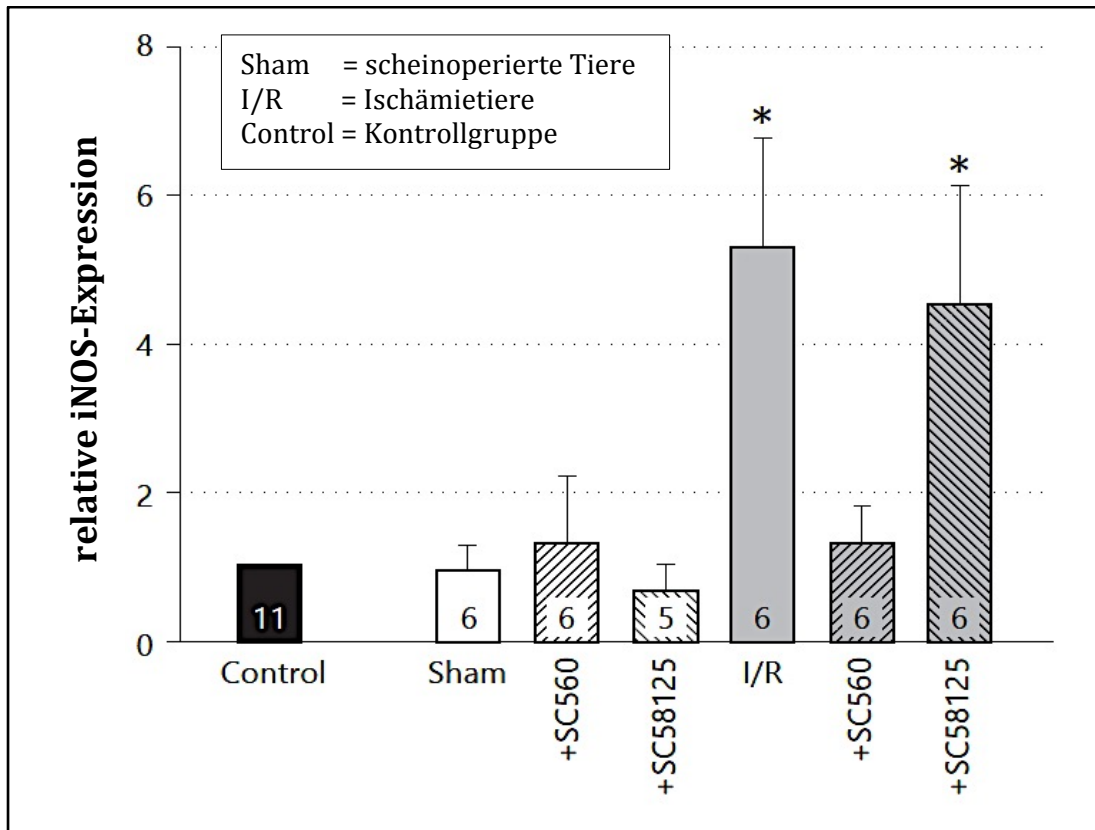


Abb. 17: Der Effekt von 1mg/kg SC560 und SC58125 auf die iNOS-Induktion im Nierenkortex 24 Stunden nach renaler Ischämie. Der mRNA-Gehalt von iNOS wurde auf das jeweilige β -Aktin-Signal normiert. Der iNOS-mRNA-Gehalt der Kontrollgruppe wurde dem Wert 1 gleichgesetzt.

* Statistisch signifikanter Unterschied zu korrespondierender Gruppe scheinputerierter Versuchstiere.

Keiner der selektiven COX-Hemmer (SC560 bzw. SC58125) zeigte einen nachweisbaren Effekt in der Gruppe der scheinputerierten Versuchstiere. Der Gehalt an iNOS-mRNA war bei den I/R-Versuchstieren stark erhöht und konnte durch den Einsatz des COX-1-Hemmers SC560 auf die Ausgangswerte zurückgeführt werden. Der COX-2-Hemmer SC58125 zeigte keine Beeinflussung der iNOS-Induktion nach renaler Minderperfusion und 24-stündiger Reperfusionsphase. Dies steht in guter Übereinstimmung mit den bereits auf renaler Expressions- und Funktionsebene erhobenen Daten.

Als dritter Marker wurde das Chemokin MCP-1 (*monocytes chemoattractant protein-1*, Makrophagen-Chemoattraktorprotein-1) untersucht, von dem bekannt ist, dass seine Synthese nach I/R-Ereignis der Niere durch den Transkriptionsfaktor NF-kappaB stimuliert wird. MCP-1 stimuliert die medulläre und kortikale Einwanderung von Monozyten und Makrophagen in die Niere nach iANV (Sung et al., 2002).

24 Stunden nach renaler Ischämie war ein dreifacher Anstieg von MCP-1-mRNA im tiefen Nierenkortex und der äußeren Nierenmarkregion nachweisbar (Abb. 18). Weder SC560 noch SC58125 konnten der ischämie-bedingten Hochregulierung von MCP-1 entgegenwirken. Dies deutet auf das Fehlen anti-inflammatorischer Effekte in der gewählten Dosierung von jeweils 1mg/kg KG hin.

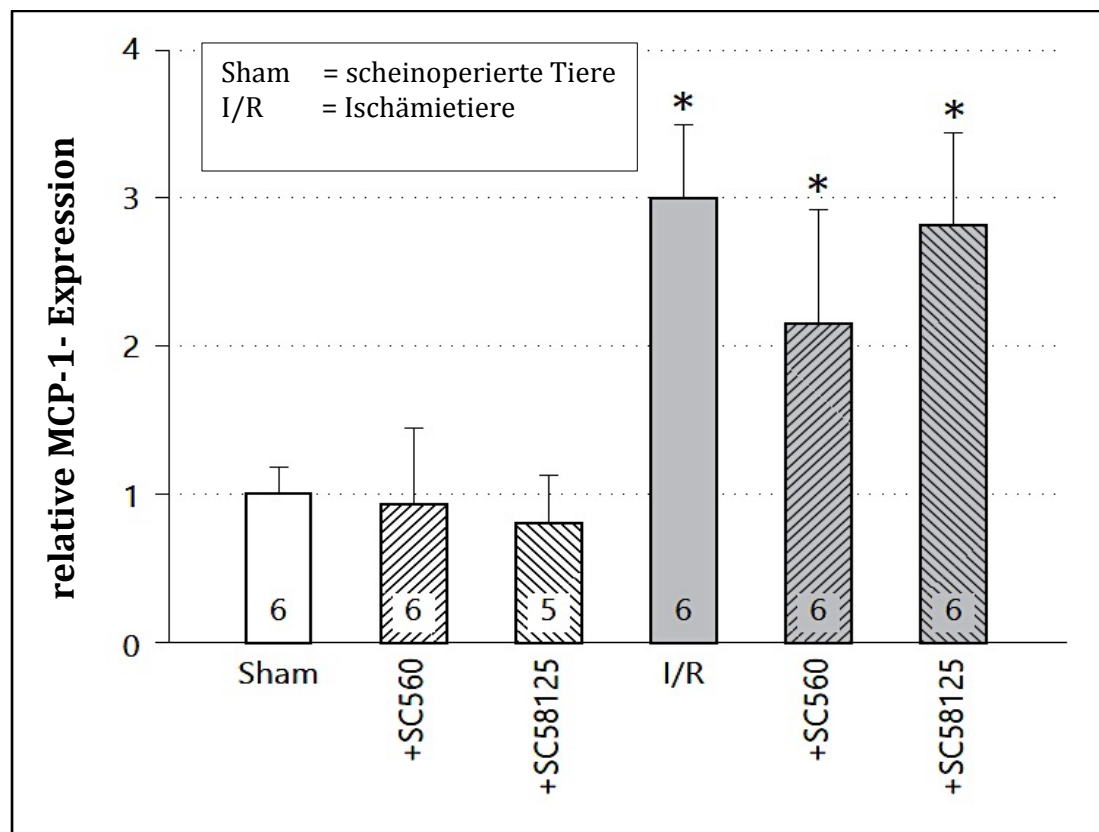


Abb. 18: Der Effekt von 1mg/kg SC560 oder SC58125 auf die Induktion von MCP-1 im Nierenkortex 24 Stunden nach renaler Ischämie. Der mRNA-Gehalt von MCP-1 wurde auf das jeweilige β -Aktin-Signal normiert.

* Statistisch signifikanter Unterschied zwischen Ischämietieren und korrespondierender Gruppe scheinoperierter Versuchstiere.

5 Diskussion

5.1 Fragestellung

Die in der vorliegenden Arbeit bearbeitete zentrale Fragestellung ergab sich als notwendige Schlussfolgerung aus vorherigen Studien, in denen gezeigt werden konnte, dass die nicht-selektive Hemmung von Cyclooxygenasen durch Indomethacin positive Auswirkungen auf das renale Outcome nach Schädigung der Niere durch Ischämie und Reperfusion zeigt und zu einer gesteigerten Expression und Funktionalität der organischen Anionentransporter Oat1 und Oat3 nach iANV führt (Schneider et al., 2009).

Können diese unter Indomethacin erzielten Effekte durch die Anwendung eines selektiven COX-1- bzw. COX-2-Hemmers weiter differenziert werden? Und welche Auswirkungen zeigt eine selektive COX-Hemmung auf das renale Outcome und das Expressionsverhalten der Transporter organischer Anionen nach iANV?

Dazu wurden die Effekte des selektiven COX1-Hemmers SC560 und des selektiven COX2-Hemmers SC58125 auf die Expression der organischen Anionentransporter Oat1 und Oat3, auf das Transportverhalten organischer Anionen und auf grundlegende Funktionsparameter der Niere untersucht.

5.2 Methodik

Die bisherige Datenlage zum zeitlichen Reaktionsverhalten der Expression der organischen Anionentransporter Oat1 und Oat3 sowie der renalen Funktion nach ischämie-bedingtem akuten Nierenversagen zeigt ein maximales Ausmaß der Schädigung innerhalb von 6 bis 24 Stunden nach Induktion der Minderperfusion (Schneider et al., 2007, 2009). Aus diesem Grund wurden Messungen auf ein Reperfusionsintervall von 24 Stunden fokussiert. Die Auswirkungen der renalen Ischämie, welche nach 24-stündiger Reperfusionsphase beobachtet werden konnten, stimmten im Wesentlichen mit bisher veröffentlichten Daten überein (Raff et

al., 2005; Schneider et al., 2007, 2009), was auf ein zuverlässiges und reproduzierbares in vivo-Modell des iANV schließen lässt.

Die in vitro verwendete O₂-Fraktion < 1% repräsentiert einen Sauerstoffpartialdruck von 7,6 mmHg. Dieser Wert wurde auch in von der Perfusion unterbrochenen Nierenarealen gemessen und befindet sich unterhalb des kritischen Partialdrucks für eine ausreichende Sauerstoffdiffusion in den Nierenkortex (Leichtweiss et al., 1964; Nelimarkka, 1984).

Der pH-Wert von 6,6 wurde aufgrund der während einer renalen Ischämie in vivo beschriebenen Azidose gewählt (Holloway et al., 1986) und sowohl vor als auch nach der Inkubationszeit kontrolliert.

Die glomeruläre Filtrationsrate (GFR) ist ein wichtiger klinischer Parameter zur Beurteilung der Nierenfunktion und beschreibt dasjenige Volumen an Primärharn, welches in einer definierten Zeiteinheit von den Glomeruli beider Nieren filtriert wird. Die renale Clearance gibt die spezifische Eliminationsleistung der Nieren an und definiert sich als die Menge an Plasmavolumen, die in einem bestimmten Zeitintervall von einer entsprechenden Substanz eliminiert wird. Mit Hilfe der renalen Clearance bestimmter Indikatorsubstanzen (Inulin, Kreatinin) kann die GFR ermittelt und somit Rückschluss auf die renale Funktion gezogen werden. Als Goldstandard für die exakte Bestimmung der GFR hat sich die Indikatorsubstanz Inulin bewährt, da sie durch die Glomeruli vollständig filtriert, im anschließenden Tubulussystem jedoch weder reabsorbiert, produziert, verstoffwechselt oder sezerniert wird. Inulin gehört zu den Fruktanen und ist ein Polysaccharid aus Fructose und besteht aus Molekülketten mit bis zu 30 Monomeren.

Ähnlich der GFR ist der renale Plasmafluss nicht direkt messbar und bedarf der Clearancebestimmung einer Messsubstanz, die im Idealfall nach einmaliger Durchströmung durch das Nierenparenchym vollständig eliminiert wird. Eine nahezu vollständige Extraktion ermöglicht die Substanz PAH, welche glomerulär filtriert und tubulär sezerniert wird. Nur ein minimaler Anteil wird über die Leber extrarenal eliminiert.

Sämtliche labortechnisch durchgeführte Messverfahren (Clearance-Messungen, Western Blot, RT-PCR) wurden nach standardisierten Protokollen durchgeführt, um vergleichbare und präzise Resultate zu erhalten.

Die operativen Eingriffe an Versuchstieren erfolgten alle durch einen Experimentator, um interindividuelle Abweichungen zu vermeiden. Zum Ausschluss tierbedingter individueller Unterschiede wurde eine entsprechend repräsentative Fallzahl gewählt.

5.3 Die selektiven COX-Hemmer SC560 (COX-1) und SC58125 (COX-2)

SC560 und SC58125 zeigen starke Ähnlichkeiten in ihrer chemischen Strukturierung und gehören beide einer heterozyklischen Klasse von Cyclooxygenase-Inhibitoren an, zu denen unter anderem auch Celecoxib und Rofecoxib zählen. SC560 hemmt COX-1 mit einer mittleren inhibitorischen Konzentration (IC_{50}) von ungefähr $0,009 \mu M$, COX2 wird dagegen erst mit einer IC_{50} von $6,3 \mu M$ gehemmt (Smith et al., 1998). Folglich hat SC560 eine 700-fach höhere Wirksamkeit zu COX-1 als zu COX-2.

SC58125 hingegen inhibiert die COX-2 mit einer IC_{50} von ungefähr $0,7 \mu M$. COX-1 benötigt eine IC_{50} von $100 \mu M$. Somit verfügt der selektive COX-2-Hemmer SC58125 über eine 150-fach höhere Wirkstärke zu COX-2 (Miralpeix et al., 1997). Zum Vergleich zeigt Indomethacin eine IC_{50} von $0,3 \mu M$ für COX1 und eine IC_{50} von $7,7 \mu M$ für COX-2 (Schneider et al., 2009).

Die Dosierung von $1 mg/kg$ Körpergewicht wurde gewählt, um zum einen eine Vergleichbarkeit zu vorangegangenen Arbeiten zu gewährleisten. Zum anderen sollte einer möglichen Verschlechterung der renalen Durchblutung vorgebeugt werden. Die renale Perfusion zeigt sich vor allem im Bereich der Medulla von Prostaglandin E_2 abhängig (Hao und Breyer, 2007) und höher gewählte Dosierungen könnten möglicherweise eine Beeinflussung dieses Regulationsmechanismus zur Folge haben. In Tat verursachte die Gabe von SC560 oder SC8125 in der Gruppe der scheinoperierten Tiere sogar eine Zunahme der Nierendurchblutung, so dass eher von einer positiven Beeinflussung der renalen Perfusion auszugehen ist.

Für Indomethacin ist eine 25-fache Akkumulierung im Bereich der proximalen Tubuluszelle der Niere der Ratte beschrieben (Cox et al., 1993). Bei einer Dosierung von 1mg/kg KG resultiert daraus eine intrazelluläre proximale tubuläre Konzentration von Indomethacin von 70 μM (Schneider et al., 2009). Diese Konzentration reicht aus, um sowohl COX-1 ($\text{IC}_{50} \sim 0.3 \mu\text{M}$) and COX-2 ($\text{IC}_{50} \sim 7.7 \mu\text{M}$) hemmen. Legt man diese Konzentrationen auch für die selektiven COX-Hemmer SC560 und SC58125 zugrunde, so sind beide Inhibitor-Konzentrationen im proximalen Tubulus der Niere ausreichend, um jeweils ihre spezifischen Zielenzyme zu hemmen

Nach 24-stündiger Reperfusionsphase zeigt die postischämische Applikation von SC560 (COX-1-Hemmer, 1mg/kg KG) einen deutlichen Anstieg der Expression von Oat1 und Oat3. Der spezifische COX-2-Hemmer SC58125 bewirkt keine Veränderungen im Expressionsverhalten der organischen Anionentransporter. Diese Ergebnisse spiegeln die in der Zellkultur gewonnenen Daten wider und unterstreichen die Arbeitshypothese, dass die durch Minderperfusion induzierte Herunterregulation der organischen Anionentransporter vor allem auf gesteigerte COX-1-Aktivität zurückzuführen ist.

Weiterführend wäre zu untersuchen, ob Änderungen der Dosierung zu ähnlich positiven Effekten durch SC560 führen und inwieweit sich daraus mögliche klinische Einsatzgebiete und Therapieansätze erarbeiten lassen.

5.4 Funktionsparameter der Niere

Um die Auswirkungen ischämisch induzierter Nierenschädigungen auf die Nierenfunktion und das renale Outcome nach Ischämie und Reperfusion näher untersuchen zu können, wurden GFR und RPF mit Hilfe der Inulin- und PAH-Clearance in An- und Abwesenheit der selektiven COX-Inhibitoren SC560 (COX-1) bzw. SC58125 (COX-2) bestimmt.

Die Applikation des selektiven COX-1-Hemmers SC560 verhindert die Minderepression der renalen organischen Anionentransporter Oat1 und Oat3 nach iANV. Die Anwendung von SC58125 zeigte keinen Effekt auf Expressionsebene. Dies legt die Vermutung nahe, dass auch das Extraktionsverhältnis von PAH als klassisches Substrat der organischen Anionentransporter durch selektive COX-1-

Hemmung positiv beeinflusst wird, da der geschwindigkeitsbestimmende Schritt bei der Extraktion organischer Anionen aus der Blutstrombahn durch die Transporter Oat1 und Oat3 vermittelt wird (Dantzler, 2002; El-Sheikk et al., 2008). Die in dieser Arbeit durchgeführten PAH-Messungen konnten diese Annahme bestätigen: Das PAH-Extraktionsverhältnis zeigte in der Gruppe der Ischämietiere mit Applikation von SC560 nach Ischämieereignis eine deutliche Zunahme der PAH-Extraktion, wohingegen SC58125 keine Zunahme der PAH-Extraktion bewirken konnte.

Zu beachten ist, dass die PAH-Clearance nicht nur von der PAH-Extraktion aus der Blutstrombahn abhängig ist, sondern auch von der aktiven Sezernierung über die apikale Membran in das Tubuluslumen, der PAH-Nettosekretion. Ist dieser apikale Transportprozess eingeschränkt, so könnte die daraus folgende intrazelluläre Übersättigung mit organischen Anionen sekundär in einer verminderten Extraktion von PAH aus der Blutstrombahn resultieren. Andererseits konnte in einer tierexperimentellen Studie nachgewiesen werden, dass die PAH-Nettosekretion nach Ischämie in gleichem Maße wie die PAH-Extraktion abnimmt (Bischoff et al., 2014) und mit einer Mindereexpression von Oat1 und Oat3 einhergeht (Schneider et al., 2007, 2009). Somit stellt die PAH-Nettosekretion eine Funktion des PAH-Extraktionsverhältnis und der basolateralen Aufnahme von PAH dar.

Höcherl et al. konnten 2009 ähnlich positive Auswirkungen auf das Expressionsverhalten von Oat1 und Oat3 und die Sekretion organischer Anionen 12 Stunden nach Ischämieereignis unter Verwendung des COX2-Inhibitors Parecoxib mit einer Dosierung von 20mg/kg nachweisen (Höcherl et al., 2009). Neben dem unterschiedlichen experimentellen Ablauf, wobei der COX-2-Hemmer 1 Stunde vor eine 30-minütigen Ischämiephase gefolgt von 12 Stunden Reperfusion verabreicht wurde, wurden die Abweichungen zu den Messungen in der vorliegenden Arbeit vor allem auf die eingesetzte hohe Dosierung von Parecoxib zurückgeführt. Parecoxib ist eine wasserlösliche Vorstufe des Cyclooxygenase-2-Hemmers Valdecoxib (Mehta et al., 2008). Werden dieselben Berechnungen für die intrazelluläre tubuläre Konzentration von Valdecoxib wie für SC560, SC58125 und Indomethacin zu Grunde gelegt, so resultiert eine tubuläre Konzentration von 100 μM . Diese ist bei weitem ausreichend, um sowohl COX-1 (IC_{50} von 21,9 μM) als auch COX-2 (IC_{50} 0,24 μM) zu hemmen (Mehta et al., 2008).

Somit stehen die hier vorgestellten Daten in guter Übereinstimmung mit der Hypothese einer über COX-1-Metabolite induzierten Herunterregulation von Oat1 und Oat3 nach renaler Ischämie. In weiterführenden Arbeiten sollte der genaue Regulationsmechanismus der Expression von Oat1 und Oat3 untersucht werden.

Der Abfall der GFR 24 Stunden nach stattgefundenener Ischämie kann durch den Einsatz von SC560 nahezu vollständig aufgehoben werden, was ein deutlicher Hinweis auf ein verbessertes Outcome der Niere nach iANV ist. Die späte Abnahme der GFR (24 Stunden nach Ischämie) wird zumindest teilweise tubuloglomerulären Rückkopplungs-Mechanismen (*Tubuloglomerular feedback*, TGF) zugeschrieben (Kim et al., 2000). Dabei kommt es durch erhöhte Natriumkonzentrationen im Tubuluslumen infolge einer gestörten Natriumresorption zu einer Konstriktion des Vas afferens des Glomerulums mit konsekutivem Abfall der GFR (Tanner und Knopp, 1986). Zudem gibt es Hinweise, dass das tubuloglomeruläre Feedback dem Einfluss von COX-1 (Araujo et al., 2010) und von COX-2 (Araujo et al., 2009) unterliegt.

Die Datenlage ist somit ausreichend, um die positiven Auswirkungen von SC560 auf die GFR zu erklären. Jedoch bietet sie keine Erklärung, warum nach der Applikation von SC58125 kein Effekt zu beobachten ist. Möglicherweise wirkt dem vorhandenen positiven Effekt von SC58125 auf die GFR durch das tubuloglomeruläre Feedback eine Hemmung der medullären Durchblutung entgegen, welche sich abhängig von der Anwesenheit von COX-2-Metaboliten zeigte (Qi et al., 2002).

Dennoch stellt die Hemmung des tubuloglomerulären Feedbacks durch eine beeinträchtigte Funktion der COX-1 einen möglichen Erklärungsansatz für die positive Beeinflussung des GFR 24 Stunden nach stattgefundenener Ischämie durch SC560 dar. Alternativ könnte die durch SC560 hervorgerufene Normalisierung der glomerulären Filtrationsrate nach I/R-Schaden der Niere auch auf eine Funktionserhaltung der Niere, bedingt durch begünstigende Effekte auf die Ausscheidung renaler Metabolite, zurückzuführen sein.

Es lässt sich zusammenfassen, dass die Durchblutung der Niere und der Funktionsparameter GFR eine positive Beeinflussung durch den selektiven COX-1-Hemmer SC560 erfahren, was auf eine protektive Rolle der Hemmung der COX-1 während der Reperfusionsphase nach renaler Ischämie schließen lässt.

5.5 Stellenwert inflammatorischer und zelluärer Prozesse

Die beeinträchtigte Ausscheidung harnpflichtiger Endprodukte des Stoffwechsels aggraviert das Schädigungsausmaß nach renaler Minderperfusion (Russ et al., 2007). Die verminderte Expression von Oat1 und Oat3 und die hierdurch hervorgerufene Akkumulation metabolischer anionischer Substanzen spielt dabei möglicherweise eine Rolle. Dementsprechend könnte durch postischämische Aufrechterhaltung der Sekretion organischer Anionen mittels Verabreichung von SC560 die durch Minderperfusion hervorgerufene Nierenschädigung reduziert werden.

Zusätzlich spielen inflammatorische Prozesse eine wesentliche Rolle bei der Entstehung renaler Schädigungen nach stattgefundener Ischämie (Bonventre et al., 2004; Kinsey et al., 2008). Das Chemokin MCP-1 wird durch Entzündungsmediatoren aktiviert und nach einem Ischämie-Reperfusionsschaden der Niere verstärkt exprimiert (Rice et al., 2002). Dies führt zu einer Chemotaxis von Monozyten und Makrophagen in das geschädigte Nierenareal. Da COX auch in inflammatorische Prozesse involviert sind, könnte deren Hemmung zu einer verbesserten Nierenfunktion nach I/R-Ereignis beitragen. In der vorliegenden Arbeit konnte eine zwar gesteigerte Synthese von MCP-1-mRNA nach I/R-Ereignis nachgewiesen werden, allerdings zeigte weder eine selektive COX-1- bzw. COX-2-Hemmung in der gegenwärtig verwendeten Dosierung eine Beeinflussung des Entzündungsmarkers MCP-1 auf Expressionsebene.

Dies steht in guter Korrelation mit zuvor erhobenen Daten anderer Arbeitsgruppen. Schneider et al. konnten nachweisen, dass die Anwendung des nicht-selektiven COX-Hemmers Indomethacin keinen Einfluss auf das Migrationsverhalten von Makrophagen und Monozyten in den renalen Kortex nach Ischämieereignis zeigt (Schneider et al., 2009). Die von Sauvant et al. gewonnenen Ergebnisse konnten keinen Effekt auf die nach I/R-Ereignis gesteigerte Synthese von MCP-1 nachweisen (Savant et al., 2010).

Die induzierbare NO-Synthase und ihre Hochregulierung im Rahmen eines iANV kennzeichnet einen weiteren wichtigen Marker zur Beurteilung einer Nierenschädigung auf Zellebene (Guan et al., 2006). Die iNOS ist hauptsächlich im proximalen Tubulus lokalisiert und dem Anstieg von Stickstoffmonoxid durch iNOS wird eine zentrale Rolle bei der Entstehung postischämischer Nierenschädigungen

zugeschrieben (Guan et al., 2006; Goligorsky et al., 2002). Im Gegensatz zu MCP-1 wird die Induktion der iNOS durch Applikation von SC560 nach I/R-Ereignis abgeschwächt. Eine COX-2-Hemmung durch SC58125 zeigte keine Beeinflussung der iNOS-Induktion.

NO ist eine potentiell vasodilatatorische Substanz mit positiver Beeinflussung des glomerulären Filtrationsdrucks und der GFR (Gardiner et al., 1990). Postischämisch scheint diese durch NO-vermittelte Regulation des Gefäßtonus trotz Anstieg der NO-Synthese negativ beeinflusst zu sein, was sich in einem Abfall der GFR und des RBF widerspiegelt. Dies wird vor allem auf eine verminderte NO-Sensibilität auf zellulärer Ebene nach iANV zurückgeführt (Kin et al., 1995).

Zusammengefasst weist die Aktivierung der iNOS verglichen mit der glomerulären Filtrationsrate als repräsentativer Funktionsparameter der Niere ein gegenläufiges Reaktionsmuster auf.

Die Ergebnisse dieser Arbeit geben einen Hinweis darauf, dass sich der Einsatz eines selektiven COX-1-Hemmers positiv auf schädigende Effekte auf Zellebene nach renaler Ischämie auswirkt. Apoptoseprozesse, welche sich nach renaler Minderperfusion ereignen, werden sowohl durch selektive COX-1- als auch COX-2-Hemmer in positiver Weise beeinflusst. In Zusammenschau mit der Tatsache, dass der Ablauf inflammatorischer Prozesse eher über COX-2 als über COX-1 gesteuert wird (Matsuyama et al., 2005) ist es unwahrscheinlich, dass die durch SC560 induzierte Verringerung eines Ischämie-Reperfusions-Schadens der Niere auf anti-entzündliche Regulationsmechanismen zurückzuführen ist.

Für das unterschiedliche funktionelle Verhalten inflammatorischer Parameter auf Zellebene lässt der erreichte Stand der in dieser Arbeit erhobenen Daten keinen ausreichend erklärenden Ansatz zu.

5.6 Die Beeinflussung des renalen Plasmaflusses durch selektive COX-Inhibitoren

Als klinischer Parameter zur Bestimmung des renalen Plasmaflusses und Beurteilung der Nierenfunktion dient die PAH-Clearance. PAH ist der Prototyp einer organischen Säure und wird nahezu vollständig während der Nierenpassage ausgeschieden. Die PAH-Extraktion erfolgt dabei über ein Transportsystem für organische Anionen in den proximalen Tubuluszellen der Niere, welches eine entscheidende Rolle bei der Ausscheidung medikamentöser und potentiell toxischer Substanzen spielt (Perri et al., 2003, Van Montfoort et al., 2003). Das Transportsystem extrahiert und sezerniert organische Anionen nahezu vollständig. Somit reflektiert die PAH-Extraktion die basolaterale Aufnahme von PAH in die proximale Tubuluszelle aus dem Blutplasma und ermöglicht damit Rückschlüsse auf die Funktions- und Transportleistung der organischen Anionentransporter.

Die während der Reperfusionsphase beobachtete Herunterregulation der organischen Anionentransporter Oat1 und Oat3 nach ischämisch induziertem akuten Nierenversagen (Matsuzaki et al., 2007; Schneider et al., 2007; Di Giusto et al., 2008) führt konsekutiv zu einer verminderten Extraktion von PAH aus dem Blutplasma. Diese Beobachtungen lassen sich durch die in dieser Arbeit erhobenen Daten bestätigen. 24 Stunden nach Ischämieereignis konnte ein signifikant erniedrigtes PAH-Extraktionsverhältnis aus dem Blutplasma detektiert werden.

Nach Nierentransplantation kommt es zu einem Abfall der PAH-Clearance für mindestens 7 Tage post transplantationem (Corrigan et al. 1999). In derselben Arbeit kamen die Autoren zu dem Ergebnis, dass der mit Hilfe der PAH-Clearance ermittelte renale Plasmafluss nach Ischämie und Reperfusion infolge einer verminderten PAH-Extraktion stark unterschätzt wird (Corrigan et al., 1999). Das bedeutet, dass eine um die PAH-Extraktion korrigierte PAH-Clearance eine authentischere Messmethode für die Bestimmung des renalen Plasmaflusses darstellt, da sie die tatsächliche Extraktion von PAH reflektiert somit eine bessere Vergleichbarkeit unterschiedlicher experimenteller Versuchsbedingungen mit variierender PAH-Extraktion aus der Blutstrombahn ermöglicht. Dieser Ansatz, dass die PAH-Clearance nicht die renale Durchblutung nach Ischämie und Reperfusion widerspiegelt, wurde bereits von mehreren Arbeitsgruppen bestätigt (Dible et al., 1950; Eisenbach et al., 1974; Myers et al., 1984). Dabei scheint die verminderte

Expression der geschwindigkeitsbestimmenden Anionentransporter Oat1 und Oat3 der proximalen Tubulusepithelzellen eine entscheidende Rolle zu spielen (Bischoff et al., 2014).

Somit würde auch die in der Literatur allgemein anzutreffende Formulierung, dass die GFR maßgeblich von der renalen Durchblutung und dem renalen Plasmafluss abhängig ist, in Frage gestellt werden, wobei die dazu vorliegende Studienlage eine hohe Heterogenität aufweist (Prowle et al., 2009) und bereits andere Arbeiten eine deutliche Diskrepanz zwischen GFR und tatsächlichem renalen Plasmafluss nachweisen konnten (Prowle et al., 2010). Das exakte Verständnis der pathogenetischen Abläufe, die einen Abfall der GFR erklären, ist damit essentiell, um weitere zielgerichtete therapeutische Strategien zu entwickeln.

Die renale Durchblutung wird in der Versuchstiergruppe der scheinooperierten Tiere sowohl durch SC560 als auch durch SC58125 positiv beeinflusst. Dieser stimulierende Effekt wird auf die Abhängigkeit der tubuloglomerulären Rückkopplung von COX-1 (Araujo et al., 2010) und COX-2 (Araujo et al., 2009) als wahrscheinlichsten Erklärungsansatz zurückgeführt.

Andererseits konnte in der Versuchstiergruppe der Ischämietiere mit 24-stündiger Reperfusionsphase nur die Applikation des selektiven COX-1-Hemmers SC560 eine Ischämie-bedingte Minderperfusion der Niere vermindern, der selektive COX-2-Hemmer SC58125 bewirkte dagegen keine Zunahme des renalen Plasmaflusses. Dies lässt sich vermutlich auf den inhibitorischen Effekt von SC58125 auf die Synthese von COX-2-Metaboliten nach Beginn der Reperfusion zurückführen. Dadurch bleibt eine Stabilisierung des medullären Plasmaflusses aufgrund fehlender COX-2-Metabolite aus (Qi et al., 2002) und der durch Hemmung des tubuloglomerulären Feedbacks induzierte positive Effekt von SC58125 auf die renale Durchblutung wird somit aufgehoben.

Demzufolge hat SC58125 insgesamt betrachtet keinen förderlichen Einfluss auf die Durchblutungssituation der Niere nach stattgefundener Ischämie. Demgegenüber steht der COX-1-Hemmer SC560 mit seinen Regulationsmechanismen den medullären Plasmafluss betreffend in Zusammenhang und führt nach I/R-Ereignis zu einer deutlich nachweisbaren Steigerung des renalen Plasmaflusses im Vergleich zu unbehandelten Ischämietieren.

Sollte sich diese mechanistische Erklärung bestätigen, würde dies einen neuen Ansatz für klinische Therapieoptionen der akuten Nierenschädigung oder nach Nierentransplantation bieten – da vor allem NSAIDs und selektive COX-2-Inhibitoren mit einem erhöhten Risiko für eine akute Nierenschädigung in Verbindung gebracht werden (Huerta et al., 2005) und eine selektive COX-1-Inhibition nach akuter ischämischer Nierenschädigung bisher nur spärlich in Studien untersucht wurde (Perrone et al., 2010; Calvello et al., 2012).

Zusammenfassend geben die aus dieser Arbeit gewonnenen Daten erste Hinweise darauf, dass ein direkt nach renaler Ischämie applizierter selektiver COX-1-Hemmer (SC560, 1mg/kg KG) positive Auswirkungen auf das renale Outcome nach I/R-Schädigung zeigt.

Ob und in welchem Ausmaß sich diese deutliche Verbesserung der Nierenfunktion mechanistisch durch positive Effekte im Bereich der tubulären Funktion, der renalen Durchblutung oder der glomerulären Filtration erklären lässt, sollte Schwerpunkt weiterführender Arbeiten sein.

6 Zusammenfassung

Resultat vorangegangener Arbeiten war eine durch den nicht-selektiven Cyclooxygenasehemmer Indomethacin (Dosierung 1mg/kg KG) induzierte Verbesserung der Expression und Funktionalität der renalen organischen Anionentransporter Oat1 und Oat3 nach Minderperfusion der Niere. Zudem verbesserte sich das renale Outcome nach Ischämie- und Reperfusionsschaden deutlich. Nachdem in der vorliegenden Arbeit unterschiedliche Effekte der selektiven COX-1- bzw. COX-2-Hemmern SC560 (COX-1) und SC58125 (COX-2) auf den Transport organischer Anionen nach Ischämie und Reperfusion in vitro nachgewiesen werden konnten, wurde Effekt von SC560 und SC58126 auf die Expression und Funktion von Oat1 und Oat3 sowie auf relevante Parameter der Nierenfunktion nach ischämisch induziertem akuten Nierenversagen im Versuchstiermodell der Ratte untersucht.

Das iAKI wurde durch beidseitiges temporäres Abklemmen der Nierenarterien für 45 Minuten induziert. Der Gehalt an Oat1 und Oat3 wurde mittels Real-Time-PCR und Western Blot ermittelt. Des Weiteren wurden die GFR (glomeruläre Filtrationsrate), PAH-Clearance und das PAH-Extraktionsverhältnis mit Bestimmung des renalen Plasmaflusses berechnet. Alle Parameter wurden nach einer 24-stündigen Reperfusionsphase detektiert.

Die Applikation des COX-1-Inhibitors SC560 bewirkte in der Versuchstiergruppe der Ischämietiere eine Restitutio der Expression von Oat1 und Oat3 und führte zu einer signifikanten Verbesserung der renalen Perfusion. Die Funktionalität der organischen Anionentransporter Oat1 und Oat3, welche den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt bei der Exkretion organischer Anionen an der basolateralen Membran der Tubulusepithelzelle der Niere vermitteln, konnte durch Anwendung des selektiven COX-1-Hemmers SC560 wieder hergestellt werden. Darüber hinaus verbesserte sich das renale Outcome, gemessen anhand der GFR, erheblich. Die Verwendung des COX-2-Inhibitors SC58125 konnte diese Resultate nicht erzielen.

Zusammenfassend deutet diese Arbeit darauf hin, dass die postischämische Anwendung des selektiven COX-1-Hemmers SC560 die durch Minderperfusion induzierte Herunterregulation von Oat1 und Oat3 während der Reperfusion verhindert und einen protektiven Effekt auf die Nierenfunktion hat. Ob und inwieweit die signifikant verbesserte renale Funktion mechanistisch auf eine verbesserte tubuläre Funktion, renale Perfusion oder glomeruläre Filtration zurückzuführen ist, bleibt Aufgabenstellung zukünftiger Arbeiten.

7 Literaturverzeichnis

Alejandro V et al. Mechanisms of filtration failure during postischemic injury of the human kidney. A study of the reperfused renal allograft. *J Clin Invest* 1995;95: 820-831.

Anderson GD, Hauser SD, McGarity KL et al. Selective inhibition of cyclooxygenase (COX)-2 reverses inflammation and expression of COX-2 and interleukin 6 in rat adjuvant arthritis. *J Clin Invest* 1996;97:2672-2679.

Bagshaw SM. Epidemiology of renal recovery after acute renal failure. *Curr Opin Crit Care* 2006; 12: 544–550.

Basile DP, Anderson MD, Sutton TA. Pathophysiology of acute kidney injury. *Compr Physiol*. 2012;2:1303–53.

Basile DP, Bonventre JV, Mehta R, et al; ADQI XIII Work Group. Progression after AKI: understanding maladaptive repair processes to predict and identify therapeutic treatments. *J Am Soc Nephrol* 2016;27:687–697.

Battilana C, Zhang HP, Olshen RA, Wexler L, Myers BD. PAH extraction and estimation of plasma flow in diseased human kidneys. *Am. J. Physiol. Renal Physiol*. 1991; 261:F726-F733.

Bellomo R, Ronco C, Kellum JA, Mehta RL, Palevsky P. Acute renal failure – definition, outcome measures, animal models, fluid therapy and information technology needs: the Second International Consensus Conference of the Acute Dialysis Quality Initiative (ADQI) Group. *crit care* 2004;8:r204-12.

Betz B et al. Rosiglitazone affects nitric oxide synthases and improves renal outcome in a rat model of severe ischemia/reperfusion injury. *PPAR Res* 2012; 2012: 219319.

Bischoff A et al. PAH clearance after renal ischemia and reperfusion is a function of impaired expression of basolateral Oat1 and Oat3. *Physiol Rep* 2014;2:e00243.

Bitekci M, Dayan A, Tekkeşin AI, et al. Incidence, risk factors, and outcomes of perioperative acute kidney injury in noncardiac and nonvascular surgery. *Am J Surg* 2014;207:53-59.

Blantz RC. The glomerular and tubular actions of angiotensin II. *Am J Kidney Dis* 1987;10(Suppl. 1), 2–6.

Blantz RC, Deng A, Miracle CM, Thomson SC. Regulation of kidney function and metabolism: a question of supply and demand. *Trans Am Clin Climatol Assoc* 2007;118:23-43.

Bonventre JV, Colvin RB. Adhesion molecules in renal disease. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 1995;5:254-261.

Bonventre JV, Zuk A. Ischemic acute renal failure: an inflammatory disease? *Kidney Int.* 2004;66(2):480–485.

Bonventre JV. Pathophysiology of acute kidney injury: roles of potential inhibitors of inflammation. *Contrib Nephrol* 2007;156:39–46.

Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976;72:248–254.

Brezis M., Rosen S. Hypoxia of the renal medulla: its implications for disease. *N Engl J Med* 1995;332:647-655.

Brivet FG, Kleinknecht DJ, Loirat P, Landais PJ. Acute renal failure in intensive care units--causes, outcome, and prognostic factors of hospital mortality; a prospective, multicenter study. French Study group on acute renal failure. *Crit Care Med* 1996;24:192-8.

Brooks DP. Role of endothelin in renal function and dysfunction. Clin Exp Pharmacol Physiol. 1996;23(4):345–348.

Buist SC, Cherrington NJ, Klaassen CD. Endocrine regulation of rat organic anion transporters. Drug Metab Dispos 2003;31:559-564.

Burckhardt G. Drug transport by organic anion transporters (OATs) Pharmacol Ther. 2012;136:106–130.

Calvello R et al. Novel selective COX-1 inhibitors suppress neuroinflammatory mediators in LPS-stimulated N13 microglial cells. Pharmacol Res 2012;65(1):137-48.

Cantley LG. Adult stem cells in the repair of the injured renal tubule. Nat Clin Pract Nephrol 2005; 1: 22–32.

Canuelo A, Siles E, Martinez-Romero R, Peinado MA, Martinez-Lara E: The nitric oxide system response to hypoxia/ reoxygenation in the aged cerebral cortex. Exp Gerontol 2007;42(12):1137- 1145.

Carmichael P, Carmichael AR. Acute renal failure in the surgical setting. ANZ J Surg. 2003;73:144–153.

Cheatham ML, Malbrain ML, Kirkpatrick A et al. Results from the International Conference of Experts on Intra-abdominal Hypertension and Abdominal Compartment Syndrome. II. Recommendations. Intensive Care Med 2007;33:951-962.

Chertow GM, Burdick E, Honour M et al. Acute kidney injury, mortality, length of stay, and costs in hospitalized patients. J AM Soc Nephrol 2005;16:3365-70.

Conger J. Hemodynamic factors in acute renal failure. Adv Ren Replace Ther 1997;4(2 suppl 1):25–37.

Corrigan G et al: PAH extraction and estimation of plasma flow in human postischemic acute renal failure. *Am J Physiol* 1999; 277:F312–F318.

Coxib and Traditional NSAID Trialists' (CNT) Collaboration Bhala N, et al. Vascular and upper gastrointestinal effects of non-steroidal anti-inflammatory drugs: Meta-analyses of individual participant data from randomised trials. *Lancet*. 2013;382(9894):769–779.

Dantzler WH: Renal organic anion transport: a comparative and cellular perspective. *Biochim Biophys Acta* 2002;1566: 169–181.

Dantzler WH, Wright SH. The molecular and cellular physiology of basolateral organic anion transport in mammalian renal tubules. *Biochim Biophys Acta* 2003;1618:185-193.

Dible JH, Bull GM, Darmady EM. Acute tubular necrosis. *Br Med J* 1950; 1:1262-1264.

Di Giusto G, Anzai N, Endou H, Torres AM. Elimination of organic anions in response to an early stage of renal ischemia - reperfusion in the rat: role of basolateral plasma membrane transporters and cortical renal blood flow. *Pharmacology* 2008;81:127-136.

Dubois R.N., Abramson S.B., Crofford L., Gupta R.A., Simon L.S., van de Putte L.B., Lipsky P.E. Cyclooxygenase in biology and disease. *FASEB J* 1998;12:1063-1073.

Eisenbach GM, Kitzlinger B, Steinhausen M. Renal blood flow after temporary ischemia of rat kidneys. Renal venous outflow and clearance techniques. *Pflugers Arch* 1974;347:223-234.

El-Sheikh AA et al. Mechanisms of renal anionic drug transport. *Eur J Pharmacol* 2008; 585: 245–255.

Feitoza CQ, Sanders H, Cenedeze M, Camara NOS, Pacheco-Silva A. Pretreatment with indomethacin protects from acute renal failure following ischemia-reperfusion injury. *Transplant Proc* 2002;34:2979-2980.

Feitoza CQ, Camara NOS, Pinheiro HS, Goncalves GM, Cenedeze MA, Pacheco-Silva A, Santos OFP. Cyclooxygenase 1 and/or 2 blockade ameliorates the renal tissue damage triggered by ischemia and reperfusion injury. *Int Immunopharmacology* 2005;5:79–84.

Fitzpatrick F.A., Soberman R. Regulated formation of eicosanoids. *J Clin Invest* 2001;107:1347–1351.

Friis C: Renal transport and metabolism of xenobiotics. *Acta Vet Scand* 1991; 32: 33–43.

Funk CD. Prostaglandins and leukotrienes: advances in eicosanoid biology. *Science* 2001;294:1871–1875.

Gardiner SM, Compton AM, Bennet T, Palmer RMJ, Moncada S. Control of regional blood flow by endothelium-derived nitric oxide. *Hypertension* 1990;15:486-492.

Gaudry S, Hajage D, Dreyfuss D. Initiation of renal-replacement therapy in the intensive care unit. *N Engl J Med* 2016;375:1901–1902.

Go AS, Chertow GM, Fan D, McCulloch CE, Hsu CY. Chronic kidney disease and the risks of death, cardiovascular events, and hospitalization. *N Engl J Med* 2004;351:1296–1305.

Gupta S et al. Isolation and characterization of kidney-derived stem cells. *J Am Soc Nephrol* 2006;17:3028–3040.

Haase M, Devarajan P, Haase-Fielitz A, Bellomo R, Cruz DN, Wagener G. The outcome of neutrophil gelatinase-associated lipocalin-positive subclinical acute kidney injury: a multicenter pooled analysis of prospective studies. *J Am Coll Cardiol* 2011;57(17):1752–1761.

Habu Y, Yano I, Takeuchi A, Saito H, Okuda M, Fukatsu A, Inui Ki. Decreased activity of basolateral organic ion transports in hyperuricemic rat kidney: roles of organic ion transporters, rOAT1, rOAT3 and rOCT2. *Biochem Pharmacol* 2003;66: 1107–1114.

Habu Y, Yano I, Okuda M, Fukatsu A, Inui Ki. Restored expression and activity of organic ion transporters rOAT1, rOAT3 and rOCT2 after hyperuricemia in the rat kidney. *Biochem Pharmacol* 2005;69:993–999.

Hao CM, Breyer MD. Physiologic and pathophysiologic roles of lipid mediators in the kidney. *Kidney international* 2007;71:1105-1115.

Hao CM, Breyer MD. Physiological regulation of prostaglandins in the kidney. *Annu Rev Physiol* 2008;70:357–377.

Harris RC. COX-2 and the kidney. *J Cardiovasc Pharmacol* 2006;47 Suppl1,S37-42.

Harris RC et al. Cyclooxygenase metabolites in the kidney. *Compr Physiol* 2011;1:1729-1758.

Hartner A, Pahl A, Brune K, Goppelt-Struebe M. Upregulation of cyclooxygenase-1 and the PGE2 receptor EP2 in rat and human mesangioproliferative glomerulonephritis. *Inflamm Res* 2000;49:345-354.

Holloway JC, Phifer T, Henderson R, Welbourne TC: Renal acid-base metabolism after ischemia. *Kidney Int* 1986;29(5):989-994.

Huerta C, Castellsague J, Varas-Lorenzo C, Garcia Rodriguez LA. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs and risk of ARF in the general population. *Am J Kidney Dis* 2005;45:531-539.

International Transporter Consortium, Giacomini K.M., Huang S.M., Tweedie D.J., Benet L.Z., Brouwer K.L. Membrane transporters in drug development. *Nat Rev Drug Discov*. 2010;9:215–236.

Jania LA et al. Microsomal prostaglandin E synthase-2 is not essential for in vivo prostaglandin E2 biosynthesis. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 2009;88:73-81.

KDIGO AKI Working Group, KDIGO clinical practice guideline for acute kidney injury. *Kidney Int Suppl* 2012;2:1-138.

Kellum JA, Levin N, Bouman C, Lameire N. Developing a consensus classification system for acute renal failure. *Curr Opin crit care* 2002;8:509-14.

Kelly KJ, Molitoris BA. Acute renal failure in the new millennium: time to consider combination therapy. *Semin Nephrol* 2000 Jan;20(1):4-19.

Kim M, Brady JE, Li G. Variations in the risk of acute kidney injury across intraabdominal surgery procedures. *Anesth Analg* 2014;119:1121-1132.

Kimura H, Takeda M, Narikawa S, Enomoto A, Ichida K, Endou H: Human organic anion transporters and human organic cation transporters mediate renal transport of prostaglandins. *J Pharmacol Exp Ther* 2002;301:293-298.

Kin S, Sasaki T, Nakayama K, Tamura K, Nakai I, Oka T. The cytoprotective role of nitric oxide in ischemia-reperfusion injury in the rat kidney; *Transplant.Proc.* 1995;27: 754-756.

Kindgen-Milles D, Pannen B. Acute kidney injury – Recovery – Which patients and why? *Anästhesiol Intensivmed Notfallmed Schmerzther* 2013;48(2): 114-120.

Komhoff M, Grone HJ, Klein T, Seyberth HW, Nusing RM. Localization of cyclooxygenase-1 and -2 in adult and fetal human kidney: implication for renal function. *Am J Physiol* 1997;272:F460–F468.

Kurata H, et al. Protective effect of nitric oxide on ischemia/reperfusion-induced renal injury and endothelin-1 overproduction. *Eur J Pharmacol* 2005;517(3):232–239.

Kwon O, Hong SM, 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*. 2009;296(1):F25–F33.

Lai CF, Wu VC, Huang TM et al. Kidney function decline after a non-dialysis-requiring acute kidney injury is associated with higher long-term mortality in critically ill survivors. *Crit Care* 2012; 16: R123.

Lassnigg A, Schmid ER, Hiesmayr M et al. Impact of minimal increase in serum creatinine on outcome in patients after cardiothorac surgery: do we have to revise current definitions of acute renal failure? *Crit Care Med* 2008;36:1129-37.

Leichtweiss HP, Lübbers DW, Weiss C, Baumgärtl H, Reschke W: The oxygen supply of the rat kidney: measurements of intrarenal pO₂. *Pflügers Arch* 1969;309(4):328-349.

Lieberthal W, Nigam SK. Acute renal failure. I. Relative importance of proximal vs. distal tubular injury. *Am J Physiol* 1998;275:F623-631.

Liu KD, Brakeman PR. Renal repair and recovery. *Crit Care Med* 2008;36:187-192.

Ljubojevic M, Herak-Kramberger CM, Hagos Y, Bahn A, Endou H, Burckhardt G, Sabolic I. Rat renal cortical OAT1 and OAT3 exhibit gender differences determined by both androgen stimulation and estrogen inhibition. *Am J Physiol Renal Physiol* 2004;287:F124-F138.

Lu H, Shi JX, Zhang DM, Shen J, Lin YX, Hang CH, Yin HX: Hemolysate-induced expression of intercellular adhesion molecule-1 and monocyte chemoattractant protein-1 expression in cultured brain microvascular endothelial cells via through ROS-dependent NF- κ B pathways. *Cell Mol Neurobiol* 2009;29(1):87-95.

Maddox D, & Brenner BM. The Kidney 6th edn Vol. 1 (eds Brenner BM, Levine SA) 2000;319–374 (W. B. Saunders, Philadelphia).

Mahon P, Shorten G: Perioperative acute renal failure. *Curr Opin Anaesthesiol* 2006;19(3):332-338.

Makris K, Spanou L. Acute Kidney Injury: Definition, Pathophysiology and Clinical Phenotypes. *Clin Biochem Rev.* 2016;37(2): 85-98.

Masferrer JL, Reddy ST, Zweifel BS, Seibert K, Needleman P, Gilbert RS, Herschman HR. In vivo glucocorticoids regulate cyclooxygenase-2 but not cyclooxygenase-1 in peritoneal macrophages. *J Pharmacol Exp Ther* 1994;270: 1340-4.

Matsuyama M, Yoshimura R, Hase T, Kawahito Y, Sano H, Nakatani T. Study of cyclooxygenase-2 in renal ischemia-reperfusion injury. *Transplant Proc* 2005;37: 370-372.

Matsuzaki T, Watanabe H, Yoshitome K, Morisaki T, Hamada A, Nonoguchi H. Downregulation of organic anion transporters in rat kidney under ischemia/reperfusion - induced acute renal failure. *Kidney Int* 2007;71:539-547.

Meersch M, Schmidt C, Zarbock A. Perioperative Acute Kidney Injury: An Under-Recognized Problem. *Anesth Analg* 2017;125(4):1223–1232.

Mehta RL, Kellum JA, Shah SV, Molitoris BA, Ronco C, Warnock DG et al. Acute Kidney Injury Network: report of an initiative to improve outcomes in acute kidney injury. *Crit Care* 2007;11:r31.

Molitoris B. Putting the actin cytoskeleton into perspective: pathophysiology of ischemic alterations. *Am J Physiol Renal Physiol* 1997;41 272: F430-F433.

Molitoris BA. Actin cytoskeleton in ischemic acute renal failure. *Kidney Int* 2004;66:871–883.

Morrissey KM, Stocker SL, Wittwer MB, Xu L, Giacomini KM. Renal transporters in drug development. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2012;53:503–529.

Murry CE, Jennings RB, Reimer KA. Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation* 1986;74:1124-1136.

Myers BD, Miller DC, Mehigan JT, Olcott CO, Golbetz H, Robertson CR. Nature of the renal injury following total renal ischemia in man. *J Clin Invest* 1984; 73:329-341.

Myers SI et al. Suprarenal aortic clamping and reperfusion decreases medullary and cortical blood flow by decreased endogenous renal nitric oxide and PGE 2 synthesis. *J Vasc Surg* 2005; 42:524–531.

Nelimarkka O, Niinikoski J: Oxygen and carbon dioxide tensions in the canine kidney during arterial occlusion and hemorrhagic hypotension. *Surg Gynecol Obstet* 1984;158(1):27-32.

Nigwekar SU, Kandula P, Hix JK, Thakar CV. Off-pump coronary artery bypass surgery and acute kidney injury: a meta-analysis of randomized and observational studies. *Am J Kidney Dis*. 2009;54:413-423.

Nørregaard R, Kwon TH, Frøkiær J. Physiology and pathophysiology of cyclooxygenase-2 and prostaglandin E2 in the kidney. *Kidney Res Clin Pract* 2015; 34(4):194-200.

Odutayo A, Adhikari NK, Barton J et al. Epidemiology of acute kidney injury in Canadian critical care units: a prospective cohort study. *Can J Anaesth* 2012;59(10):934-42.

Park JY, Pillinger MH, Abramson SB. Prostaglandin E2 synthesis and secretion: the role of PGE2 synthases. *Clin Immunol* 2006;119:229-240.

Perri D, Ito S, Rowsell V, Shear NH. The kidney—the body's playground for drugs: an overview of renal drug handling with selected clinical correlates. *Can J Clin Pharmacol* 2003; 10:17-23.

Perrone MG, Scilimati A, Simone L, Vitale P. Selective COX-1 inhibition: A therapeutic target to be reconsidered. *Curr Med Chem* 2010;17:3769-3805.

Piccinni P , Cruz DN , Gramaticopolo S et al. Prospective multicenter study on epidemiology of acute kidney injury in the ICU: a critical care nephrology Italian collaborative effort (NEFROINT). *Minerva Anesthesiol* 2011;77:1072-1083.

Prowle JR, Ishikawa K, May CN, Bellomo R. Renal blood flow during acute renal failure in man. *Blood Purif.* 2009;28: 216–225.

Prowle JR, Ishikawa K, May CN, Bellomo R. Renal plasma flow and glomerular filtration rate during acute kidney injury in man. *Ren Fail* 2010 Jan;32(3):349-55.

Raff U, et al. L -Arginine does not affect renal morphology and cell survival in ischemic acute renal failure in rats. *Nephron Physiol* 2005;101: 39–50.

Redfors B, Bragadottir G, Sellgren J, Swärd K, Ricksten SE. Effects of norepinephrine on renal perfusion, filtration and oxygenation in vasodilatory shock and acute kidney injury. *Intensive Care Med* 2011;37:60-67.

Reyes JL, Melendez E, Alegria A, Jaramillo-Juarez F. Influence of sex differences on the renal secretion of organic anions. *Endocrinology* 1998;139:1581-1587.

Rice JC, Spence JS, Yetman DL, Safirstein RL. Monocyte chemoattractant protein-1 expression correlates with monocyte infiltration in the post-ischemic kidney. *Ren Fail.* 2002;24(6):703-23.

Rizwan AN, Burckhardt G. Organic anion transporters of the SLC22 family: biopharmaceutical, physiological, and pathological roles. *Pharm. Res.* 2007;24:450-470.

Sakurai M., Oishi K, Watanabe K. Localization of cyclooxygenases-1 and -2, and prostaglandin F synthase in human kidney and renal cell carcinoma. *Biochem Biophys Res Commun* 2005;338,82-86.

Sauvant C et al: Short-term regulation of basolateral organic anion uptake in proximal tubular OK cells: prostaglandin E₂ acts via receptor mediated activation of PKA. *J Am Soc Nephrol* 2003;14:3017-3026.

Sauvant, C, Holzinger H, Gekle M. Prostaglandin E₂ inhibits its own renal transport by downregulation of organic anion transporters rOat1 and rOat3. *J Am Soc Nephrol* 2006;17, 46-53.

Sauvant C et al: Implementation of an in vitro model system for investigation of reperfusion damage after renal ischemia. *Cell Physiol Biochem* 2009; 24: 567-576.

Sauvant C et al: Indomethacin corrects alterations associated with ischemia/reperfusion in an in vitro proximal tubular model. *Am J Nephrol* 2010; 32:57-65.

Schneider R et al: L -Arginine counteracts nitric oxide deficiency and improves the recovery phase of ischemic acute renal failure in rats. *Kidney Int* 2003; 64: 216-225.

Schneider R et al. Downregulation of organic anion transporters OAT1 and OAT3 correlates with impaired secretion of para-aminohippurate after ischemic acute renal failure in rats. *Am J Physiol* 2007;292:F1599-1605.

Schneider R et al: Low-dose Indomethacin after ischemic acute kidney injury prevents down regulation of Oat1/3 and improves renal outcome. *Am J Physiol* 2009;297:F1614-F1621.

Schnermann J. Homer W. Smith Award lecture. The juxtaglomerular apparatus: from anatomical peculiarity to physiological relevance. *J Am Soc Nephrol* 2003;14:1681–1694.

Sekine T, Watanabe N, Hosoyamada M, Kanai Y, Endou H. Expression cloning and characterization of a novel multispecific organic anion transporter. *J Biol Chem*. 1997;272:18526–18529.

Sekine T, Miyazaki H, Endou H. Molecular physiology of renal organic anion transporters. *Am. J. Physiol. Renal Physiol*. 2006;290:F251-F261.

Sawhney S, Marks A, Fluck N, Levin A, Prescott GJ, Black, C. Intermediate and long-term outcomes of survivors of acute kidney injury episodes: a large population-based cohort study. *Am J Kidney Dis*. 2017;69:18-28.

Sharfuddin AA, Molitoris BA. Pathophysiology of ischemic acute kidney injury. *Nat Rev Nephrol*. 2011;7:189-200.

Smith HW, Goldring W, Chasis H. The measurement of the tubular excretory mass, effective blood flow and filtration rate in the normal human kidney. *J Clin Invest* 1938;17:263-278.

Smith WL. Prostanoid biosynthesis and mechanisms of action. *Am J Physiol* 1992;263,F181-191.

Smith CJ, Zhang Y, Koboldt CM et al. Pharmacological analysis of cyclooxygenase-1 in inflammation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:13313-13318.

Spiegel DM, Wilson PD, Molitoris BA. Epithelial polarity following ischemia: a requirement for normal cell function. *Am J Physiol* 1989;256:F430-F436.

Star RA. Treatment of acute renal failure. *Kidney Int* 1998;54(6):1817-1831.

Sweet DH, Wolff NA, Pritchard JB. Expression cloning and characterization of ROAT1. The basolateral organic anion transporter in rat kidney. *J Biol Chem* 1997;272:30088-30095.

Tanner GA, Knopp LC. Glomerular blood flow after single nephron obstruction in the rat kidney. *Am J Physiol* 1986; 250:F77-85.

Tapuria N, Kumar Y, Habib MM, Abu Amara M, Seifalian AM, Davidson BR. Remote ischemic preconditioning: a novel protective method from ischemia reperfusion injury—a review. *J Surg Res* 2008;150:304-330.

Teng XW, Abu-Mellal AK, Davies NM. Formulation dependent pharmacokinetics, bioavailability and renal toxicity of a selective cyclooxygenase-1 inhibitor SC-560 in the rat. *J Pharm Pharm Sci* 2003;6:205-10.

Terlouw SA, Masereeuw R, Russel FG. Modulatory effects of hormones, drugs, and toxic events on renal organic anion transport. *Biochem Pharmacol* 2003;65:1393-1405.

Thakar CV, Yared JP, Worley S, Cotman K, Paganini EP. Renal dysfunction and serious infections after open-heart surgery. *Kidney Int* 2003;64:239–246.

Tokuyama H et al: Stenosis-dependent role of nitric oxide and prostaglandins in chronic renal ischemia. *Am J Physiol Renal Physiol* 2002; 282:F859-F865.

Tokuyama H et al. Role of nitric oxide and prostaglandin E2 in acute renal hypoperfusion. *Nephrology (Carlton)* 2003;8(2):65-71.

Tögel F, Westenfelder C. Recent advances in the understanding of acute kidney injury. *F1000Prime Rep.* 2014;6:83.

Uchino S, Kellum Ja, Bellomor, Doig GS, Morimatsu H, Morgera S, et al. Acute renal failure in critically ill patients: a multinational, multicenter study. *JAMA* 2005;294:813-8.

Uchino S, Bellomo R, Kellum JA et al. Patient and kidney survival by dialysis modality in critically ill patients with acute kidney injury. *Int J Artif Organs* 2007;30:281-292 .

Van Montfoort JE, Hagenbuch B, Groothuis GM, Koepsell H, Meier PJ, Meijer DK. Drug uptake systems in liver and kidney. *Curr. Drug Metab.* 2003;4:185-211.

Vane JR. Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for the aspirin-like drugs. *Nature* 1971;231:232-235.

Villar SR, Brandoni A, Anzai N, Endou H, Torres AM. Altered expression of rat renal cortical OAT1 and OAT3 in response to bilateral ureteral obstruction. *Kidney Int* 2005;68:2704-2713.

Warren JV, Brannon ES, Merrill AJ. A method of obtaining renal venous blood in unanesthetized persons with observations on the extraction of oxygen and sodium para - aminohippurate. *Science* 1944;100:108-110.

Wirz H, Pathologische Physiologie und Klinik der Nierensekretion: Drittes Freiburger Symposium an der Medizinischen Universitäts-Klinik 1954;3-4.

Wright SH et al. Molecular and cellular physiology of renal organic cation and anion transport. *Physiol Rev* 2004; 84: 987-1049.

Ysebaert DK et al. Identification and kinetics of leukocytes after severe ischaemia/reperfusion renal injury. *Nephrol Dial Transplant* 2000;15(10):1562-74.

Yunos NM, Bellomo R, Hegarty C et al. Association between a chloride-liberal vs chloride-restrictive intravenous fluid administration strategy and kidney injury in critically ill adults. *JAMA* 2012;308:1566-1572.

Zarbock A et al. Effect of remote ischemic preconditioning on kidney injury among high-risk patients undergoing cardiac surgery: a randomized clinical trial. *JAMA* 2015; 2;313(21):2133-41.

Zarbock A, Kellum JA, Schmidt C et al. Effect of early vs delayed initiation of renal replacement therapy on mortality in critically ill patients with acute kidney injury: the ELAIN randomized clinical trial. *JAMA* 2016;315:2190-219

8 Thesen

1. Die durch renale Minderperfusion induzierte Herunterregulation organischer Anionentransporter wird durch COX-1 vermittelt.
2. Eine selektive Hemmung der COX-1 durch SC560 hebt die Ischämie-bedingte Herunterregulation der organischen Anionentransporter auf Proteinebene auf.
3. Das PAH-Extraktionsverhältnis wird durch Applikation des selektiven COX-1-Hemmers SC560 nach einem renalen Ischämieereignis positiv beeinflusst.
4. Der renale Plasmafluss wird durch die Applikation des Cyclooxygenase-1-Hemmers SC560 nach Ischämie und Reperfusion positiv beeinflusst.
5. Die PAH-Clearance nach Ischämie und 24-stündiger Reperfusionsphase wird maßgeblich durch die verminderte renale Extraktion von PAH infolge einer Herunterregulation der organischen Anionentransporter Oat1 und Oat3 beeinflusst.
6. Der Stellenwert der renalen Minderperfusion nach ischämisch induziertem Nierenversagen ist aufgrund fehlender Korrektur der PAH-Clearance überschätzt.
7. Der Abfall der glomerulären Filtrationsrate nach iANV ist nicht auf einen eingeschränkten renalen Blutflusys zurückzuführen.

Selbstständigkeitserklärung

Ich erkläre, dass ich die Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe. Alle Regeln der guten wissenschaftlichen Praxis wurden eingehalten; es wurden keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt und die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht.

Halle (Saale), 24.06.2019

Ariane Braun

Erklärung über frühere Promotionsversuche

Ich versichere, dass keine früheren Promotionsversuche mit dieser oder einer anderen Dissertation erfolgt sind. Es wurde nur dieser Antrag auf Eröffnung eines Promotionsverfahrens eingereicht.

Halle (Saale), 24.06.2019

Ariane Braun

Danksagung

Ein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. Michael Bucher für die Ermöglichung und Durchführung der umfangreichen tierexperimentellen Arbeit im Rahmen des regulären Klinikbetriebes und für die Übernahme der Betreuung und Begutachtung meiner Arbeit.

Herrn PD Dr. rer. nat. Christoph Sauvant möchte ich ganz herzlich für die stets engagierte und motivierte Betreuung dieser Arbeit danken; für die Bereitstellung des interessanten Themas und den Einblick in die tierexperimentelle Wissenschaft. Probleme und Ergebnisse wurden zeitnah besprochen und für jedes Anliegen gab es stets ein offenes Ohr. Vielen Dank.

Ein herzlicher Dank gilt auch Herrn Dr. Bernhard Hiebl als ehemaliger Leiter des Zentrums für Medizinische Grundlagenforschung und verantwortlicher Tierarzt für die Beratung und Organisation aller tierexperimentellen Fragen und Anforderungen.

An Frau Busse und ihre Mitarbeiter ein großes Dankeschön für die liebevolle Pflege und Unterbringung der Versuchstiere.

Vielen Dank an Sarah Reime und alle Mitarbeiter des physiologischen Julius-Berstein-Instituts für Physiologie für die geduldige Einführung und praktische Unterstützung bei labortechnischen Arbeitsabläufen und Messverfahren.

Von Herzen möchte ich meinem Ehemann Clemens Braun für sein stetiges Zuhören, seine Rücksichtnahme und seine Aufmunterungen während der Fertigstellung dieser Arbeit danken.

Mein ganz besonderer Dank gilt meinen Eltern Steffi und Jürgen Bischoff für die stetige Unterstützung während meiner Studien- und Qualifikationszeit. Danke für die ermutigenden Worte und die liebevolle Motivation für die Anfertigung und Vollendung dieser Arbeit.