

**Aus dem Fachbereich Medizin
der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main
Institut für Kardiovaskuläre Physiologie
Direktor: Prof. Dr. med. R. Brandes**

**In vivo Analyse der Rolle der löslichen Epoxidhydrolase
in der Progression der Niereninsuffizienz bei der Maus**

**Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades
des Fachbereichs Medizin
der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main**

**vorgelegt
von Felix Jansen
aus Freiburg**

Frankfurt am Main, 2010

Dekan: Prof. Dr. J. Pfeilschifter

1.Gutachter: Prof. Dr. R. Brandes

2.Gutachter: PD Dr. O. Jung

Tag der mündlichen Prüfung: 18.05.2010

1 Inhaltsverzeichnis

1	Inhaltsverzeichnis	1
2	Einleitung	1
2.1	Epidemiologie, Ätiologie und Einteilung der Niereninsuffizienz	1
2.2	Krankheitsverlauf und Therapiemöglichkeiten	5
2.3	Überblick über den Arachidonsäurestoffwechsel	8
2.4	EET-Stoffwechsel und sEH	9
2.5	sEH und Niere	10
2.6	Ziel der Studie	11
3	Material und Methoden	13
3.1	Material	13
3.1.1	Puffer und Lösungen	13
3.1.2	Chemikalien und Medikamente	15
3.1.3	Instrumente und Nahtmaterial	15
3.1.4	Geräte	16
3.1.5	Materialen und Futtermittel	16
3.1.6	Tiere	17
3.2	Methoden	17
3.2.1	Tiermodell und Studiendesign	17
3.2.2	Tierstamm und Haltung	19
3.2.3	Operation - Technik der 5/6 Nephrektomie	20
3.2.4	Postoperative Beobachtung und Verabreichung der Medikamente	23
3.2.5	Systolische Blutdruckmessung und Uringewinnung	24
3.2.6	Biochemische Analysen	25
3.2.7	Tötung und Organentnahme	37
3.2.8	Nierenhistologische Auswertung	38
3.2.9	Statistische Auswertung	39
4	Ergebnisse	40
4.1	Überlebensrate	40
4.2	Entwicklung des Körper- und des Herzgewichts	41
4.3	Entwicklung des Blutdrucks	42
4.4	Entwicklung der Albuminurie	43

4.5	EET Konzentrationen und Derivate	45
4.5.1	EET- und DHET Konzentrationen	45
4.5.2	HETE Konzentrationen	48
4.6	Renale Enzym Expression	51
4.6.1	sEH Expression in der Niere	51
4.6.2	5-Lox-, 12-Lox- und 15-Lox Expression in der Niere.....	52
4.6.3	Phospholipase A ₂ -, CYP2C40- und CYP2C38 Expressionen in der Niere.	52
4.7	1471-Plasmaspiegel	53
4.8	Nierenhistologie.....	54
4.8.1	Glomerulosklerose.....	54
4.8.2	Tubulointerstitieller Schaden.....	56
5	Diskussion.....	58
5.1	Die Rolle der sEH im Modell der chronischen Niereninsuffizienz bei der Maus	58
5.2	Eine Hemmung der sEH führt zu EET-Akkumulation und Anstieg der LOX- Produkte.....	60
5.3	Eine CYP-Inhibition durch Fenbendazol hat keinen Einfluss auf die Progression der Niereninsuffizienz bei der Maus	64
6	Zusammenfassung	65
7	Literaturverzeichnis	68
8	Eidesstattliche Erklärung	76
9	Lebenslauf	77

2 Einleitung

2.1 Epidemiologie, Ätiologie und Einteilung der Niereninsuffizienz

Die chronisch progressive Niereninsuffizienz spielt in der heutigen Medizin eine zunehmend bedeutende Rolle. Von 1997 bis 2006 war in Deutschland im Durchschnitt ein jährlicher Zuwachs der Prävalenz der Patienten mit chronischer Nierenersatztherapie um 4,4% und ein Anstieg der Inzidenz um 5,1% zu verzeichnen (QuaSi-Niere.de).

Am 31.12.2006 gab es insgesamt 91.718 Patienten, die mit einer Nierenersatztherapie behandelt wurden. Davon waren 66.508 Dialysepatienten, 25.210 erhielten Nachsorge nach einer Transplantation. Im Jahr 2006 allein wurden 17.548 Patienten aufgrund einer terminalen Niereninsuffizienz dialysepflichtig. Die häufigsten Diagnosen bei Therapiebeginn im Jahre 2006 waren

- Diabetes Typ II (32 %)
- Vaskuläre Nephropathie (24%)
- Glomerulonephritis (13%)

Weitere Ursachen waren Interstitielle Nephritis (8%) Zystennieren (5%), Systemerkrankungen (4%) und Diabetes Mellitus Typ I (2%). Bei 8% war die Genese unbekannter Ursache.

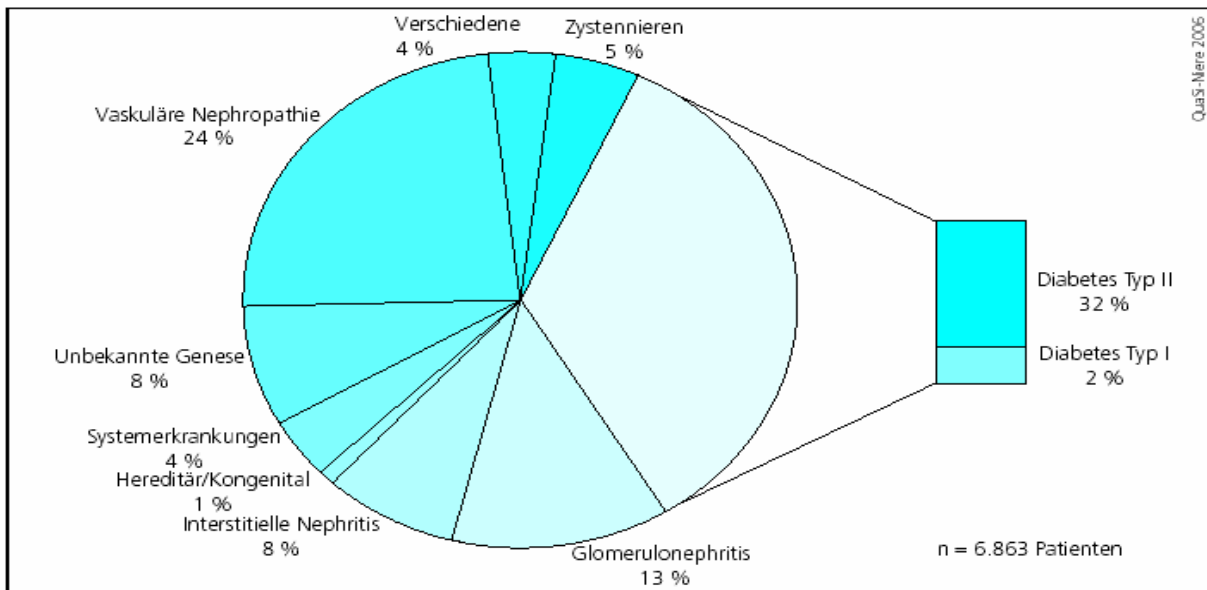


Abb. 1. Diagnoseverteilung der Patientin bei Therapiebeginn 2006. Quelle: QuaSi-Niere.de

Analog zu den Prävalenz- und Inzidenzzahlen stieg auch die Mortalität der Patienten unter Nierenersatztherapie an: Im Jahr 1995 verstarben insgesamt 6.392 dialysepflichtige Patienten in Deutschland, im Jahr 2006 betrug die Zahl 12.130 (QuaSi-Niere.de). Die jährliche Sterbequote liegt bei dialysepflichtigen Patienten in Deutschland bei 15-20% (Frei und Schober-Halstenberg, H. J., 1999). Vor diesem Hintergrund spielt die chronische Niereninsuffizienz auch gesundheitsökonomisch eine zunehmend wichtige Rolle. Nach der deutschen Gesellschaft für Nephrologie sind die kompletten Aufwendungen sowohl für Personal als auch für Sacheinsatz für Dialysepatienten auf ca. 55.000 € pro Jahr pro Patient zu beziffern. In den USA wurden am 31.12.2006 insgesamt 506.256 Patienten einer Nierenersatztherapie zugeführt, die Kosten dafür lagen allein im Jahr 2006 bei 22,7 Milliarden Dollar (Levey et al., 2003, United States Renal Data System 2008, 2009). Die aufwendigen therapeutischen Maßnahmen, die mit der Nierenersatztherapie verbunden sind, werden hauptsächlich in industrialisierten Ländern durchgeführt, so dass die chronische Niereninsuffizienz in weniger entwickelten Ländern meist einen letalen Ausgang hat (Levey et al., 2003).

Die steigende Prävalenz ist hauptsächlich auf die Zunahme der ätiologisch wichtigen Zivilisationskrankheiten Arterielle Hypertonie und Diabetes mellitus zurückzuführen. So ist 10 Jahre nach Erkrankungsbeginn bei 25% aller Diabetiker eine Mikroalbuminurie als frühester Parameter einer beginnenden diabetischen Nephropathie nachweisbar (Adler et al., 2003). Des Weiteren spielt die zunehmende Überalterung der Bevölkerung eine Rolle. Der Tatsache, dass eine Überalterung der Gesellschaft zu einer erhöhten Prävalenz an Nierenerkrankungen führt, liegt zum Einen in der physiologischen Abnahme der GFR um

7-12 ml/min/1,73m² pro Lebensjahrzehnt begründet. Zum Anderen treten in zunehmenden Alter Risikofaktoren für die Entstehung einer Niereninsuffizienz wie Diabetes mellitus und Arterielle Hypertonie gehäuft auf.

Für die Definition einer chronischen Niereninsuffizienz nennt die National Kidney Foundation zwei Bedingungen, wobei die Erfüllung einer der Kriterien zur Diagnosestellung ausreicht (K/DOQI clinical practice guidelines for chronic kidney disease, 2002):

- 1) Eine über 3 Monate andauernde Nierenschädigung, definiert durch strukturelle oder funktionelle Anomalien, mit oder ohne Einschränkung der glomerulären Filtrationsrate (GFR), die sich manifestiert in pathologischen Anomalien oder Markern einer Nierenschädigung, inklusive Anomalien in der Zusammensetzung des Blutes oder Urins, oder Anomalien in bildgebenden Verfahren.
- 2) GFR <60 ml/min/1,73m² über 3 Monate, mit oder ohne Nierenschädigung

Zur Kontrolle der Nierenfunktion ist die Berechnung der glomerulären Filtrationsrate gebräuchlich, die angibt, wie viel Blutvolumen in einer bestimmten Zeit glomerulär filtriert wird. Da sich die Nierenfunktion in absoluten Größen in etwa proportional zum Körperoberfläche verhält, wird diese als Bezugsgröße mit in die Formel aufgenommen. Eine Abnahme der GFR kann ein Zeichen für eine sich verschlechternde Nierenfunktion sein, eine dauerhaft niedrige GFR ist ein eindeutiger Hinweis auf eine bestehende chronische Niereninsuffizienz (Hunsicker et al., 1997).

Anhand der GFR etablierte die US-amerikanische National Kidney Foundation die Einteilung der chronischen Niereninsuffizienz in fünf Stadien:

Stadium	GFR in ml/min/1,73m ²	Stadienbeschreibung
1	>90	Nierenerkrankung ohne Funktionseinschränkung (mit Proteinurie) oder Normalbefund (ohne Proteinurie)
2	60-89	Nierenerkrankung mit milder Funktionseinschränkung (mit Proteinurie), ohne Proteinurie nur milde Nierenfunktionsstörung
3	30-59	Nierenerkrankung mit moderater Funktionseinschränkung
4	15-29	Nierenerkrankung mit schwerer Funktionseinschränkung
5	<15	Nierenversagen

2.2 Krankheitsverlauf und Therapiemöglichkeiten

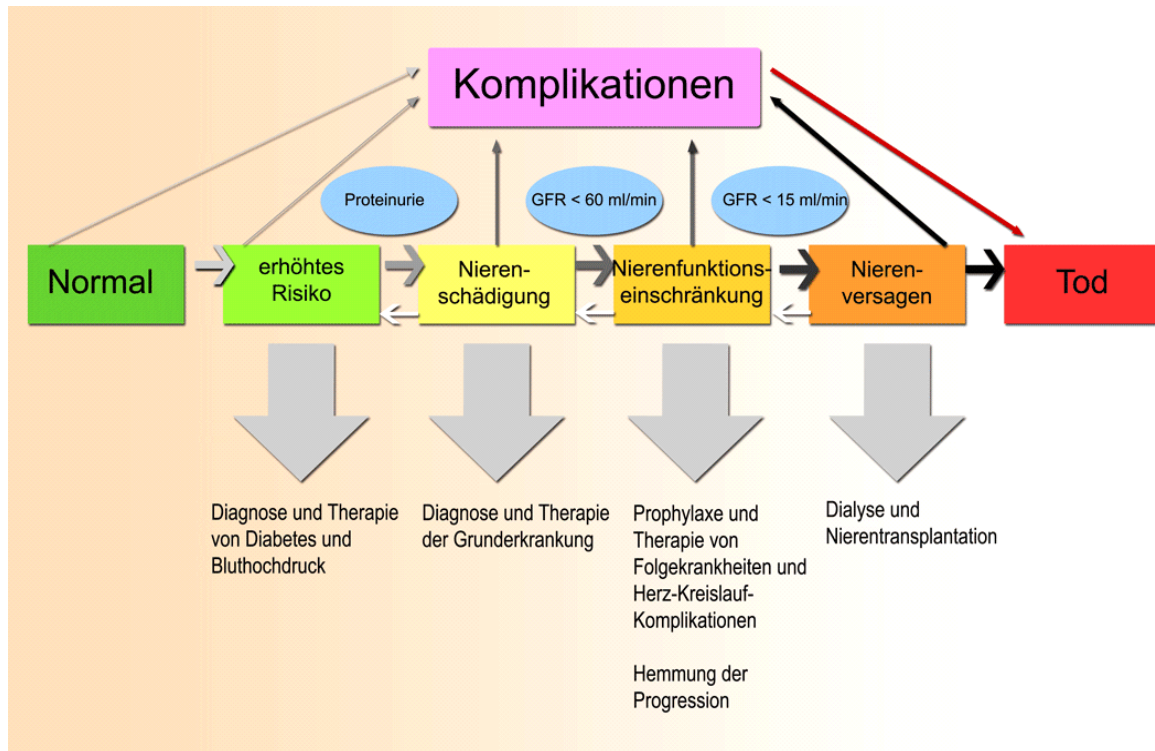


Abb. 2. Verlauf, Folgen und Maßnahmen der chronischen Niereninsuffizienz, Quelle: modifiziert nach KDOQI Clinical Practice Guidelines for Chronic Kidney Disease: Evaluation, Classification, and Stratification. Chronic Kidney Disease: Course, outcome, measures.

Der Verlauf der chronischen Niereninsuffizienz zeichnet sich durch eine irreversible Progression aus, in deren Rahmen es zu einer Vielzahl an Komorbiditäten kommen kann. Eine retrospektive Studie an 259 Patienten zeigte beispielsweise, dass bei 87% eine arterielle Hypertonie, bei 40% kardiovaskuläre Erkrankungen, bei 35% ein Diabetes und bei 14% eine periphere arterielle Verschlusskrankheit vorlag (Khan et al., 2002). Die Haupttodesursache bei Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz sind kardiale Komplikationen. So waren im Jahr 2006 in Deutschland 39,7% der Todesfälle kardialer Genese, in den USA fanden sich 1998 vergleichbare Werte (Foley et al., 1998). Des Weiteren spielten in Deutschland im Jahr 2006 als Todesursachen Infektionen (17,8%) und vaskuläre Schäden (11,8%) eine Rolle (QuaSi-Niere).

Zur Pathophysiologie der Niereninsuffizienz wurden von Brenner und Mitarbeitern in den Achtziger Jahren wegweisende Studien veröffentlicht. Aus diesen Studien geht hervor, dass die pathophysiologische Reaktion auf Ebene der Glomeruli einer geschädigten Niere relativ uniform abläuft, während der auslösende Initiationsfaktor unterschiedlicher Natur sein kann. Demnach kommt es zu Beginn der Niereninsuffizienz zunächst zu einer adaptiven (kompensatorischen) Hyperperfusion und Hyperfiltration des Einzelneurons.

Deren Folge war in den Versuchen Brenner's eine Hypertrophie der Glomeruli, Filtration von Protein und Ablagerung im Mesangium unter dem Bild der fokalen segmentalen Glomerulosklerose (Brenner et al., 1982). Die Exkretion von Protein spielt in diesem Zusammenhang nicht nur eine Rolle als Pädiktionsmarker, sondern ist auch als unabhängiger pathogenetischer Faktor mit schädigenden Auswirkungen auf die Nierenfunktion etabliert (Remuzzi und Bertani, T., 1990). Die Proteinultrafiltrate sind toxisch und führen zu tubulärer Schädigung, interstitieller Entzündung und Vernarbung (Remuzzi und Bertani, T., 1998). Diese Veränderungen führen wiederum zu einem Absinken der GFR, woraufhin als Reaktion auf eine sinkende Filtrationsrate des Einzelneurons die Tubuluszellen des juxtaglomerulären Apparates die Substanz Renin sezernieren. Im Rahmen einer nachgeschalteten Enzymkaskade entsteht hieraus das Peptidhormon Angiotensin II. Angiotensin II zeigt ein sehr breites Wirkungsspektrum. Es führt unter anderem zur Ausschüttung von Aldosteron aus der Nebennierenrinde. Aldosteron bindet an einen Rezeptor in den distalen Tubuli der Niere. Dadurch kommt es zur Rückresorption von Natrium-Chlorid und Wasser sowie zur Ausscheidung von Wasserstoff und Kalium. Durch diesen Effekt erhöht sich das intravasale Volumen und damit der systemische Blutdruck. Unabhängig von diesem Effekt hat sich gezeigt, dass Aldosteron sowohl am Herzen als auch an der Niere zu Fibrosierung und dadurch zur Verschlechterung der Nierenfunktion führt (Brilla et al., 1993, Greene et al., 1996). Des Weiteren zeigt Angiotensin II eine Reihe an Wirkungen, die unabhängig von Aldosteron zur Progredienz der Niereninsuffizienz führen. Zu den Wichtigsten gehören die Entwicklung einer

- Hypertrophie und Proliferation des Nierengewebes durch Aktivierung von Transforming growth factor β (TGF β) (Johnson et al., 1992, Kaneto et al., 1994),
- Inflammation durch Aktivierung von Nuklear Faktor κ B (NF- κ B) (Ruiz-Ortega und Egido, J., 1997)
- Proteinurie durch Vasokonstriktion der efferenten Arteriole der Tubuli und damit einhergehendem erhöhtem intraglomerulärem Druck (Yoshioka et al., 1987, Remuzzi und Bertani, T., 1998)

Der Zusammenhang zwischen Nierenschädigung, Hyperfiltration, Proteinurie, Glomerulosklerose, Angiotensin II Bildung, lokale Nierenschädigung, arterielle Hypertonie und daraus resultierender Nierenschädigung macht deutlich, dass es sich bei dem Pathomechanismus der chronischen Nephropathie um einen Circulus vitiosus handelt.

Um den beschriebenen Teufelskreis zu verhindern und ggfs. zu durchbrechen, orientiert sich die Behandlung der chronischen Nierenerkrankung, wie in obiger Graphik dargestellt, an folgenden Grundsätzen (Schieppati A et al., 2005):

- Behandlung der reversiblen Ursachen der renalen Dysfunktion
- Verhinderung bzw. Progressionshemmung der chronischen Niereninsuffizienz
- Behandlung der Komplikationen der Nierenerkrankung
- Identifikation und adäquate Vorbereitung der Patienten, die eine Dialyse und/oder Transplantation benötigen

Gegenstand besonderen Interesses der Forschung zum Thema „chronische Nierenerkrankung“ sind die Möglichkeiten der Progressionshemmung. Bereits 1986 wiesen Anderson und Mitarbeiter diesbezüglich die Wirksamkeit des ACE-Hemmers nach (Anderson et al., 1985, Anderson et al., 1986), deren Wirkung sich besonders bei Patienten mit höhergradiger Proteinurie zeigt (Jafar et al., 2003). Viel diskutiert wurde die Wirksamkeit einer Eiweißrestriktion. Auf dem Boden der MDRD-Studie und verschiedenen Metaanalysen wird nun eine Eiweißrestriktion von 0,6-0,75g Protein/Kilogramm Körpergewicht/Tag empfohlen (Klahr et al., 1994, Levey et al., 1999). Andere Studien untersuchten die Wirksamkeit von Statinen, deren Effekt möglicherweise zur Progressionshemmung bei der chronischen Nierenerkrankung führt (Moorhead et al., 1982, Keane, 1994), wobei die Ergebnisse widersprüchlich waren. Bei Patienten mit diabetischer Nephropathie kommt es durch eine konsequente Blutzuckereinstellung zur Progressionshemmung der Mikroalbuminurie (Ohkubo et al., 1995). Rauchen beschleunigt den GFR-Verlust bei der chronischen Nierenerkrankung, daher sollten die betroffenen Patienten das Rauchen einstellen (Remuzzi, 1999). Erst kürzlich zeigte eine große klinische Studie, dass die Behandlung der renalen Anämie als Komplikation der Niereninsuffizienz weder einen Nutzen bezüglich der kardiovaskulären oder nephrogenen Komplikationen, noch bezüglich der Progression der chronischen Niereninsuffizienz hat (Pfeffer et al., 2009). Insgesamt sind die Studienergebnisse der verschiedenen Ansätze zur Progressionshemmung der Niereninsuffizienz unbefriedigend. Zusammengefasst stellen die aktuellen Therapieempfehlungen vor allem die Behandlung der Proteinurie und der Arteriellen Hypertonie mit einem ACE-Hemmer oder einem AT-II Antagonisten in den Vordergrund, begleitet von einer möglichen Eiweißrestriktion und einer strengen Blutzuckereinstellung bei Diabetikern (Chobanian et al., 2003, Meguid El und Bello, A. K., 2005).

2.3 Überblick über den Arachidonsäurestoffwechsel

Ausgangssubstanz für die Bildung der verschiedenen Eicosanoide (Prostazykline, Leukotriene und Epoxyeicosatriensäuren) ist die Arachidonsäure. Drei verschiedene Stoffwechselwege und dementsprechend drei verschiedene Enzyme sind an deren Bildung beteiligt (siehe Abb. 3): Die Cyclooxygenase (COX), die Lipoxygenase (LOX) und Cytochrom P450 (CYP). Die COX produziert Prostaglandine. COX-Hemmer stellen eine effektive Therapie gegen Schmerzen und Entzündung dar und werden ebenso zur Prävention von Schlaganfall und Myokardinfarkt eingesetzt (Fitzgerald, 2004, Grosser et al., 2006). Leukotrienrezeptorantagonisten spielen in der Therapie von Asthma und Allergien eine Rolle (Ribeiro et al., 2006, Capra et al., 2007). Der dritte, CYP assoziierte, Stoffwechselweg wird durch die Cytochrom P450-Epoxygenasen und Cytochrom P450-Hydroxylase vermittelt (Oliw et al., 1981, Capdevila et al., 1982, Chacos et al., 1982). Die CYP-Epoxygenasen führen zu der Bildung von 4 regioisomären EETs: 5,6 EET, 8,9 EET, 11,12 EET und 14,15 EET. Auf die Wirkung der EETs wird im Abschnitt 2.4 näher eingegangen. Die CYP-Hydroxylase (z.B. CYP4A1) wandelt Arachidonsäure in Hydroxyeicosatetranoidsäure (HETE) um. 20-HETE, der Hauptmetabolit dieses Stoffwechselweges, zeigt proinflammatorische Eigenschaften an menschlichen Endothelzellen (Roman, 2002, Ishizuka et al., 2008).

Folgende Abbildung fasst die beschriebenen Stoffwechselwege noch einmal zusammen:

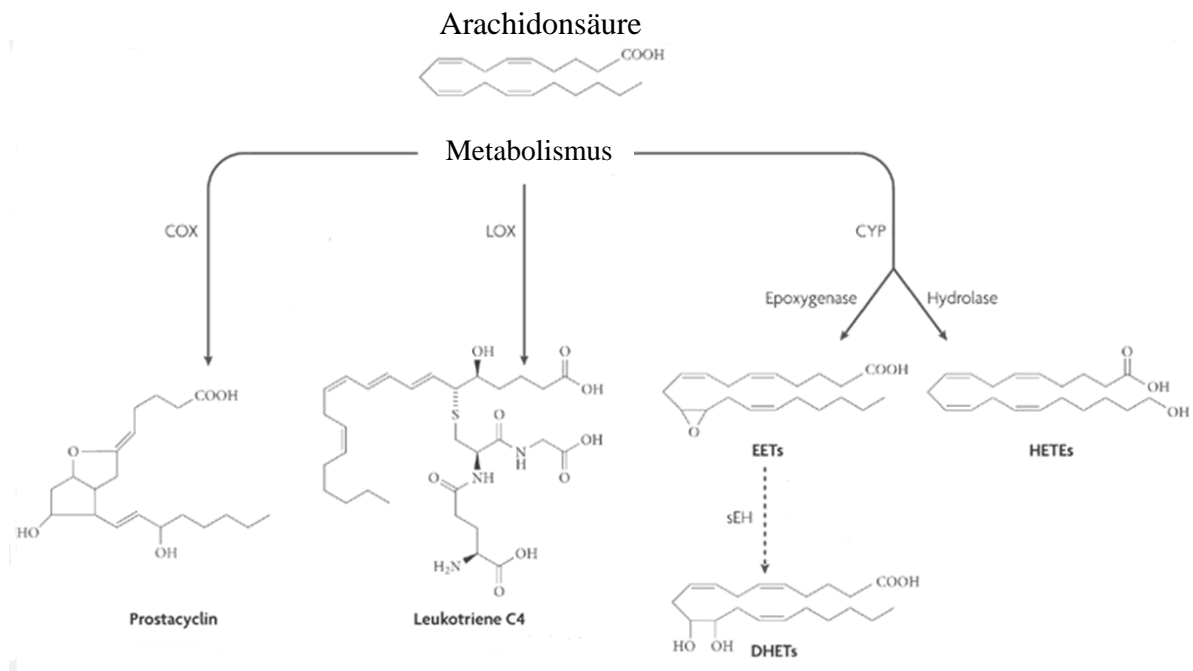


Abb. 3. Überblick über den Stoffwechsel und die Wirkungsweise der verschiedenen Arachidonsäuremetaboliten. Quelle: modifiziert nach "soluble epoxide hydrolase as a therapeutic target for cardiovascular disease" (Imig und Hammock, B. D., 2009)

2.4 EET-Stoffwechsel und sEH

Wie oben beschrieben, sind EETs ein Metabolit der Arachidonsäure. Abgebaut werden sie durch die lösliche Epoxidhydrolase (soluble epoxid hydrolase, sEH) zu Dihydroxy-Derivaten (DHETs) (siehe Abb. 3). Die Aktivität der sEH wird dabei als determinierender Faktor für die Bioverfügbarkeit der EETs angesehen (Yu et al., 2004). Organe mit einer hohen sEH Expression sind Leber, Niere und Retina; sie wird aber ebenso in Endothelzellen, glatten Muskelzellen und Leukozyten expremiert (Draper und Hammock, B. D., 1999, Yu et al., 2004). Die EETs zeigen vasodilatative, antientzündliche, angiogenetische und antiproliferative Eigenschaften (Campbell, 2000, Node et al., 2001, Roman, 2002, Imig, 2005, Fleming, 2008). Die Vasodilatation wird über Calcium abhängige Kalium-Kanäle der glatten Muskelzellen des Endothels vermittelt. Es kommt zum Kalium-Ausstrom, damit einhergehender Hyperpolarisation und Gefäßdilatation (Fisslthaler et al., 1999). Aufgrund der beschriebenen Eigenschaften gehören die EETs vermutlich zu den *endothelium derived hyperpolarizing factors* (EDHF), (Campbell et al., 1996, Spector et al., 2004, Imig, 2005, Fleming, 2007, Gross et al., 2008). Die Aktivierung der CYP Epoxygenase in Endothelzellen mit daraus resultierender EET-Freisetzung ist ein

wichtiger Schritt in der Stickstoffmonoxid-(NO) und Prostacyclin (PGI₂) unabhängigen Gefäßdilatation (Michaelis und Fleming, I., 2006). Die antientzündliche Wirkung ließ sich durch die EET-vermittelte Transkriptionshemmung an NF- κ B nachweisen (Node et al., 1999). Des Weiteren hemmen EETs die Leukozytenadhäsion an Endothelzellen (Pratt et al., 2002). Die angiogenetischen Eigenschaften zeigten sich in menschlichen- und Mäusezelllinien, wo eine CYP2C Überexpression und damit eine verstärkte EET Bildung zu Angiogenese und Endothelzellproliferation führte (Fleming, 2007). Gegensätzlich dazu ließen sich EET spezifische antiproliferative und antimigratorische für glatte Gefäßmuskelzellen nachweisen. Dieser Effekt wird über einen G-Protein gekoppelten Stoffwechselweg vermittelt (Fleming, 2007b).

Die antihypertensiven Eigenschaften der EETs konnten Yu und Mitarbeiter erstmals im Jahr 2000 im Bluthochdruckmodell bei der Ratte zeigen (Yu et al., 2000). Der Zusammenhang zwischen Angiotensin II vermittelter Hypertonie und der Rolle der sEH wurde später im Tiermodell weiter untersucht (Imig et al., 2002, Jung et al., 2005). Dabei zeigten Jung und Mitarbeiter, dass die sEH einen entscheidenden Faktor bei der AT II induzierten Hypertonie darstellt. Dementsprechend verhinderte die Behandlung mit einem oralen sEH-Inhibitor eine AT II induzierte Hypertonie im Tiermodell. Ein Erklärungsansatz für den blutdrucksenkenden Effekt der sEH-Inhibition bei Angiotensin II vermittelter Hypertonie ist die gesteigerte Nierendurchblutung mit daraus resultierender Druckdiurese und damit einhergehender verstärkter Natriumexkretion (Jung et al., 2005).

2.5 sEH und Niere

Die beschriebenen antihypertensiven, antiinflammatorischen und antiproliferativen Eigenschaften der EETs legen die Vermutung nahe, dass eine Erhöhung der EET Konzentration durch sEH-Inhibition möglicherweise eine protektive Wirkung hinsichtlich der Progressionshemmung der Niereninsuffizienz hat. Diese Vermutung bestätigte sich dahingehend, als dass in sich im Angiotensin II vermittelten Bluthochdruckmodell bei der Ratte durch sEH-Inhibition eine Blutdrucksenkung herbeiführen ließ. Folglich zeigte sich eine protektive Wirkung bezüglich des Endorganschadens der Niere (Zhao et al., 2004, Imig et al., 2005). Dabei führte die orale Gabe eines sEH-Inhibitors zu einer verminderten Kollagenbildung in Glomeruli und Tubuluszellen sowie zu einer herabgesetzten Hypertrophie der Glomeruli. Des Weiteren ließ sich eine Verminderung der Albuminausscheidung, eine Reduktion der Makrophageninfiltration und eine Reduktion

der ED1 (Marker für aktivierte Makrophagen) positiven Zellen nachweisen (Imig et al., 2005). In einer aktuellen Studie ergaben sich weitere Hinweise auf den Zusammenhang zwischen der sEH-Expression und der Nierenschädigung bei arterieller Hypertonie. Die Daten wiesen nach, dass eine Deletion des sEH-Gens im Bluthochdruckmodell bei der Maus zu einer Verminderung des Blutdrucks und der renalen Inflammation führt (Manhiani et al., 2009). Ebenfalls im Jahr 2009 ergaben Studien, dass der sEH-Inhibitor AUDA nephroprotektive Eigenschaften unabhängig von der Blutdrucksenkung im Tiermodell hat (Olearczyk et al., 2009). Dabei konnte der sEH-Inhibitor AUDA zwar nicht den Blutdruck im Angiotensin II Modell bei der Ratte senken. Es zeigte sich jedoch, dass die mit AUDA behandelten Tiere eine verminderte Proteinurie und einen geringeren glomerulären und tubulointerstitiellen Schaden aufwiesen. Diese Ergebnisse lassen sich dadurch erklären, dass der Verlauf der chronischen Niereninsuffizienz durch eine Reihe von sekundären Faktoren beeinflusst wird. So haben eine Vielzahl an Studien gezeigt, dass systemischer- und intraglomerulärer Bluthochdruck, glomeruläre Hypertrophie, Hyperlipidämie und ein veränderter Eikosanoidstoffwechsel zur Verschlechterung der Nierenfunktion führen (Jacobson, 1991, Nagata und Kriz, W., 1992, Yu, 2003). Angelehnt an diese Erkenntnisse, insbesondere in Bezug auf den Eikosanoidstoffwechsel, entwickelte sich die Idee des vorliegenden Studienprojekts.

2.6 Ziel der Studie

Ziel der vorliegenden Studie war es, die Wirkungsweise eines oral-applizierten sEH-Inhibitors (in diesem Falle 1471) im Modell der chronischen Niereninsuffizienz bei der Maus zu untersuchen. Die Fragestellung war, ob eine Hemmung der sEH zu einer Verlangsamung der Progredienz der chronischen Niereninsuffizienz führt, so wie es bisher nur für den ACE-Hemmer bekannt ist. Zum Vergleich wurde zusätzlich eine Gruppe mit Fenbendazol, einem Antihelmentikum mit CYP inhibitorischen Eigenschaften, behandelt. Durch diesen Ansatz erhofften wir uns Aufschluss darüber zu erhalten, welchen Verlauf die chronische Niereninsuffizienz nimmt, wenn medikamentös in den EET-Metabolismus eingegriffen wird. Durch 1471 wurde zum Einen der Abbau der EETs gehemmt mit daraus resultierender EET- Akkumulation, mit Fenbendazol wurde zum Anderen die Synthese der EETs gehemmt. So ließ sich die Rolle der EETs im Modell der chronischen Niereninsuffizienz bei der Maus explorieren. Um den Status einer Niereninsuffizienz zu induzieren, wurde ein Teil der Versuchstiere zunächst 5/6 nephrektomiert. Als Parameter für das Auftreten und das Ausmaß der Niereninsuffizienz wurden die

Albuminausscheidung im Urin und der arterielle Blutdruck gemessen. Um die Wirkung des sEH-Inhibitors zu kontrollieren, wurden die Konzentration der verschiedenen EET-Isomere und der sEH-Spiegel im Plasma bestimmt. Die operierten Tiere wurden in verschiedene Gruppen eingeteilt:

Gruppennummer	Methode	Therapie
Gruppe 1	5/6 Nephrektomie	Placebo (Leitungswasser)
Gruppe 2	sham	Placebo (Leitungswasser)
Gruppe 3	5/6 Nephrektomie	sEH-Inhibitor (1471)
Gruppe 4	sham	sEH-Inhibitor (1471)
Gruppe 5	5/6 Nephrektomie	ACE-Hemmer (Ramipril)
Gruppe 6	sham	ACE-Hemmer (Ramipril)
Gruppe 7	5/6 Nephrektomie	CYP-Inhibitor (Fenbendazol)
Gruppe 8	sham	CYP-Inhibitor (Fenbendazol)

Die Versuchsdauer betrug 8 Wochen.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Puffer und Lösungen

Puffer / Lösung	Inhalt	Konzentration
Blocking Lösung (Elisa)	Tris Natriumchlorid BSA pH 8,0	50 mM 0,14 M 1%
Coating Lösung (Elisa)	Mausspezifischer Albumin Antikörper Karbonat-Bikarbonat pH 9,6	1 µl 0,05 M
Konjugat Lösung (Elisa)	Albumin Antikörper (Ziege) Mit Standard Lösung 1:20.000 verdünnt	
Standard Lösung (Elisa)	Tris Natriumchlorid BSA Tween 20 pH 8,0	50 mM 0,14 M 1% 0,05 %
Substrat Lösung (Elisa)	TMB	100 µl
Schwefelsäure (Elisa)		2 M
Waschlösung (Elisa)	Tris Natriumchlorid Tween 20 pH 8	50 mM 0,14 M 0,05 %
Paraformaldehyd (PFA)		4%

Lysepuffer (Western Blot)	Triton-X-100	1%
	Tris/HCl	50 mmol/l
	NaCl	150 mmol/l
	Natriumpyrophosphat	10 mmol/l
	Natriumfluorid	25 mmol/l
	EDTA	2 mmol/l
	EGTA	2 mmol/l
	Orthovanadate	2 mmol/l
	Trypsininhibitor	10 µg/ml
	Leupeptin	2 µg/ml
	Pepstatin A	2 mg/ml
	Antipain	2 µg/ml
	PMSF	40 µg/ml
	pH	7,5
Laufpuffer (Western Blot)	Glycin	160 mmol/l
	SDS	3,6 mmol/l
	Tris/HCl	25 mmol/l
Probenpuffer (Western Blot) (Laemmlipuffer)	Natriumdodecylsulfat (SDS)	2%
	β-Mercaptoethanol	5%
	Glycerin	10%
	Bromphenolblau	0,001%
	Tris/HCl	63 mmol/l
	pH 6.8	
Transferpuffer (Western Blot)	Glycin	160 mmol/l
	Tris/HCl	25 mmol/l
	Methanol	20%
TBST-Puffer (Western Blot)	Tween	0,3%
	NaCl	20 mM
	Tris/HCl	50 mM
	pH	7,5
„Stripping-Puffer“ (Western Blot)	Tris/HCl	67,5 mmol/l
	β-Mercaptoethanol	100 mol/l
	SDS	2%

PBS (Phosphat buffered saline)	NaCl	8 g
	KCl	0.2 g
	Na ₂ HPO ₄	1.44 g
	KH ₂ PO ₄	0.24 g

3.1.2 Chemikalien und Medikamente

Chemikalie / Medikament	Herstellerfirma
ACE-Hemmer Ramipril	Aventis Pharma Deutschland GmbH
sEH Inhibitor 1471	University of California, USA
PFA	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Seelze
Ethanol	Merck KGaA, Darmstadt
0,9% Natriumchlorid	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Braunol	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Buprenorphin	Essex Pharma GmbH, München
Ampicillin	Ratiopharm GmbH, Ulm
Schwefelsäure	Bethyl Laboratories, Montgomery, USA
TMB	Bethyl Laboratories, Montgomery, USA
Tween 20	Bethyl Laboratories, Montgomery, USA
Tris	Bethyl Laboratories, Montgomery, USA
BSA	Bethyl Laboratories, Montgomery, USA
Mausspezifischer Albumin Antikörper	Bethyl Laboratories, Montgomery, USA
Albumin Antikörper (Ziege)	Bethyl Laboratories, Montgomery, USA
Fenbendazol	Universitätsklinikum Mainz

3.1.3 Instrumente und Nahtmaterial

Instrument / Nahtmaterial	Herstellerfirma
Chirurgische Schere BC545R	Aesculap AG & Co. KG, Tuttlingen
Instrument zum Schließen und Lösen von Nahtclips	FST, Bad Oeynhausen

Chalazionspinzette	Moria, Antony, Frankreich
Chirurgische Pinzette Standard 14,5 cm	Aesculap AG & Co. KG, Tuttlingen
Anatomische Pinzette OC 021R OC 021R	Aesculap AG & Co. KG, Tuttlingen
Anatomische Pinzette OC 022R	Aesculap AG & Co. KG, Tuttlingen
Mikropinzette Uhrmachermodell BD 343R	Aesculap AG & Co. KG, Tuttlingen
Feather Skalpell Fig. Nr. 11	pfm - Produkte für die Medizin AG, Köln
Einmal Kanülen G26	Neobject, Gelnhausen
Hautclips	Bruneau, Frankreich
Nahtmaterial Prolene 6-0	Ethicon, Norderstedt
Nahtmaterial Perma Hand Seide 3-0	Ethicon, Norderstedt
Sterile Einwegspritzen 1ml	B. Braun Melsungen Ag, Melsungen

3.1.4 Geräte

Geräte	Herstellerfirma
Präzisionswaage	Sartorius AG, Göttingen
Blutdruckmessgerät BP 2000	Visitech Systems, Apex, USA
ELISA Plate reader	Dynatech Laboratories, Chantilly, USA
Haarschneider	Ermilia, Unterkirnach
Zentrifuge	Eppendorf, Hamburg
Mikroskop	Leica Mikrosystems GmbH, Wetzlar
Tandem-Massenspektrometer, API 4000	Applied Biosystems, Darmstadt
LI-COR Odyssey	LI-COR Bioscience GmbH, Bad Homburg

3.1.5 Materialien und Futtermittel

Materialien und Futtermittel	Herstellerfirma
Haltungsfutter für Mäuse	Ebeco, Castrop-Rauxel

Makrolonkäfige	Ebeco, Castrop-Rauxel
Leukosilk 2,5 cm	Beiersdorf, Hamburg
Kryobox	A. Hartenstein GmbH, Würzburg
Reaktionsgefäße 1,5 ml, 2 ml	Eppendorf AG, Hamburg
Pipettenspitzen	Starlab, Hamburg
Weichholzgranulat	Ebeco, Castrop-Rauxel
Metabolische Käfige	Tecniplast Deutschland GmbH, Hohenspeißenberg
Steriles Tuch	Barrier, Göteborg, Schweden
Wattestäbchen	NOBA Verbandmittel Danz GmbH u. CoKG, Wetter

3.1.6 Tiere

129S1/SVImJ Mäuse	Charles Rivers WIGA Deutschland GmbH, Sulzfeld
-------------------	---

3.2 Methoden

3.2.1 Tiermodell und Studiendesign

Das Ziel unseres Tiermodells war es, durch eine 5/6 Nephrektomie (5/6 Nx) den Zustand einer chronisch progressiven Niereninsuffizienz zu induzieren. Den Tieren wurde dafür in einer ersten Operation ein Ast der Arteria renalis sinistra ligiert. Dabei wurde der Ast gewählt, der die Blutzufuhr des apikalen Nierenpols sicherstellte. Im selben Eingriff wurde der basale Nierenpol abgetrennt, sodass nur noch 1/3 der Niere adäquat perfundiert und funktionsfähig war. Eine genaue Beschreibung der Operation erfolgt später in Kapitel 2.2.3.

In einem zweiten Eingriff eine Woche nach der ersten Operation wurde die rechte Niere vollständig entnommen. Den Tieren wurden somit insgesamt eine 5/6 Nephrektomie zugeführt.

In den Versuchsreihen dieser Studie wurde ausschließlich mit männlichen Tieren des 129S1/SVImJ Stamms gearbeitet, da die Entwicklung einer Glomerulosklerose infolge einer 5/6 Nx bei der Maus abhängig von dem genetischen Hintergrund ist (Ma und Fogo, A. B., 2003). Zu Beginn der experimentellen Untersuchungen wurden Ausgangsblutdruckwerte und die Albuminausscheidungen ermittelt. Zusätzlich wurden die Mäuse gewogen, um die Medikation an das Körpergewicht anzupassen. Die Mäuse wogen im Durchschnitt 30 g und hatten bei Versuchsbeginn ein Alter von 7-8 Wochen.

Es fand eine randomisierte Einteilung in 8 Gruppen statt. Die Tiere aus vier dieser Gruppen wurden einer 5/6 Nephrektomie unterzogen, den Tieren der restlichen vier Gruppen wurde eine „sham“ (engl. „Schein“) Operation zugeführt. Die postoperative Behandlung der Tiere erfolgte wie folgt:

Gruppennummer	Methode	Therapie
Gruppe 1	5/6 Nephrektomie	Placebo (Leitungswasser)
Gruppe 2	Sham	Placebo (Leitungswasser)
Gruppe 3	5/6 Nephrektomie	sEH-Inhibitor (1471) 15 mg/kg Körpergewicht(KG)/Tag
Gruppe 4	Sham	sEH-Inhibitor (1471) 15 mg/kg KG/Tag
Gruppe 5	5/6 Nephrektomie	ACE-Hemmer (Ramipril) 40 mg/kg KG/Tag
Gruppe 6	Sham	ACE-Hemmer (Ramipril) 40 mg/kg KG/Tag
Gruppe 7	5/6 Nephrektomie	CYP-Inhibitor (Fenbendazol) 15 mg/kg KG/Tag
Gruppe 8	Sham	CYP-Inhibitor (Fenbendazol) 15 mg/kg KG/Tag

Am 3. Tag nach der 2. Operation wurde mit der Behandlung begonnen. Um den Progress der Niereninsuffizienz beurteilen zu können, wurden nach 4 und 8 Wochen der systolische

Blutdruck gemessen und ein 24 Stunden Sammelurin gewonnen. Nach Ablauf der Versuchsdauer (8 Wochen) wurden die Tiere gewogen und es erfolgte eine Blutentnahme. Nach dem Exitus wurden den Tieren Herz, Niere(n), Aorta und Plasma entnommen.

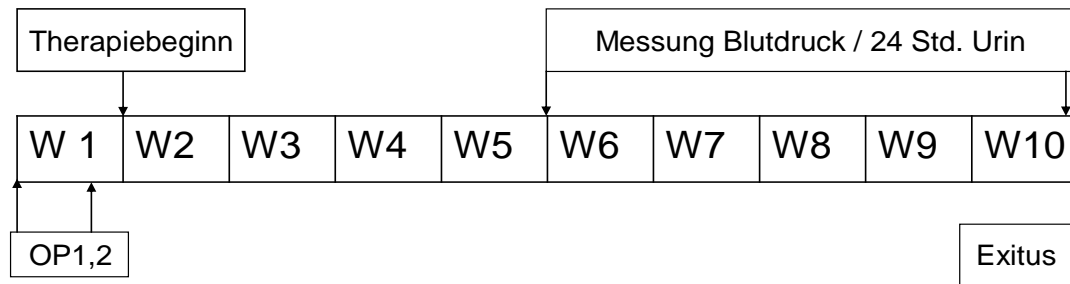


Abb.4. Überblick über den Versuchsablauf

3.2.2 Tierstamm und Haltung

Alle Versuche wurden an 129S1/SVImJ Mäusen durchgeführt, da Vorversuche neben entsprechenden Literaturangaben gezeigt hatten, dass sich dieser Stamm für das Modell besonders gut eignet.

Die Tiere wurden von Charles Rivers Deutschland GmbH bezogen und mindestens eine Woche vor Versuchsbeginn geliefert, um eine ausreichende Gewöhnung der Tiere an die neue Umgebung zu gewährleisten. Alle Versuche fanden unter Berücksichtigung des deutschen Tierschutzgesetzes statt.

Alle Versuchstiere wurden während des gesamten 10 wöchigen Versuchs den Räumlichkeiten des Kardiovaskulären Instituts der Physiologie des Universitätsklinikums Frankfurt gehalten. Zwischen 1 und 6 Tieren befanden sich gemeinsam in Makrolon Käfigen. Sie hatten freien Zugang zu Futter (normales Haltungsfutter) und Trinkwasser. Im Tierstall herrschten Temperaturen um 22° C und eine Luftfeuchtigkeit von 50%. Ein 12 Stunden Tag/Nacht Rhythmus war durch automatisierte künstliche Beleuchtung aufrechterhalten.

3.2.3 Operation - Technik der 5/6 Nephrektomie

3.2.3.1 Vorbereitungen

Zunächst wurden die Mäuse mit dem Narkosegas Isofluran narkotisiert, damit die Tiere großzügig über dem Eingriffsbereich rasiert werden konnten. Zwischen der Rasur und dem Operationsbeginn wurde der Operationsbereich steril abgedeckt und die sterilen Instrumente um den Operationsbereich herum geordnet. Zur Analgesie wurde den Tieren 0,33 mg/kg Körpergewicht Buprenorphin (Temgesic ®) verabreicht, welches in 100 µl 0,9% NaCl gelöst war. Zur periinterventionellen Infektprophylaxe erfolgte zusätzlich eine subkutane Gabe von Ampicillin (800mg/Kg Körpergewicht). Anschließend folgte die korrekte Lagerung der Tiere in Bauchlage, um den Operationsbereich gut zugänglich zu machen. Abschließend wurde der Eingriffsbereich großzügig mit Braunol desinfiziert und die Narkosetiefe durch einen Schmerzreiz an der Pfote überprüft.

3.2.3.2 Operation und Technik der 5/6 Nephrektomie

Nach Abschluss der beschriebenen Vorbereitungen erfolgte ein kleiner linksseitiger Flankenschnitt (Abb. 4). Diese kleine Hautinzision wurde durch Spreizen mit einer stumpfen anatomischen Pinzette vergrößert, bis die Öffnung groß genug war, um einen problemlosen Zugang zu der Niere zu gewährleisten. Die darunter liegende Muskelschicht wurde im nächsten Schritt mit einer stumpfen Pinzette vorsichtig durchtrennt und gespreizt, so dass man nun freie Sicht auf die linke Niere, das umgebende Fettgewebe, die Milz und Darmanteile hatte. In einem nächsten Schritt wurde die Nebenniere stumpf von der Niere anpräpariert und im Peritoneum belassen. Durch Erfassen des perirenaln Fettgewebes mittels Pinzette ließ sich die Niere ohne direkte Berührung des Organs durch die Muskelinzision aus dem Peritoneum ziehen (Abb. 5).

Nun wurde die Niere vorsichtig mit einer Chalazionspinzette fixiert, wobei darauf zu achten war, dass die renale Perfusion aufrechterhalten wurde. Mit einer stumpfen Pinzette und sterilen Wattestäbchen wurde nun das den Gefäßstiel umgebende Bindegewebe vorsichtig entfernt, so dass nun die Niere, die versorgende Arteria renalis sinistra und die entsprechende Vene mit ihren jeweiligen Ästen frei präpariert waren (Abb. 6). Nach Aufsuchen der oberen Polararterie wurde diese vorsichtig mit einer Mikropinzette von der darunter liegenden Vene getrennt. Es folgte dann das Umschlingen der Polararterie mit

einem Ethicon Prolene 6-0 Faden mittels Mikropinzette und die Ligatur des Gefäßes (Abb. 7 und Abb. 8). Der Erfolg der Gefäßligatur wurde überprüft, indem darauf geachtet wurde, ob das zu versorgende Areal der Arterie (je nach Größe des Gefäßes ein Drittel bis die Hälfte der Niere) minderperfundierte und sich bläulich livide verfärbte (Abb. 8). Im nächsten Schritt wurde dann der untere Pol mit einem Skalpell so ablatiert, dass insgesamt nur noch ein Drittel der Niere perfundierte und funktionell erhalten war (Abb. 9). Die Blutung nach der Ablation ließ sich mit einem sterilen Wattestäbchen gut stoppen. Jetzt konnte die fixierende Chalazionspinzette gelöst werden und die Niere glitt durch die Inzision in der Muskelschicht wieder ins Peritoneum zurück. Der Zugang durch den Muskel wurde mit dem Ethicon Perma-Hand 3-0er Faden mit 2-3 Einzelknopfnähten zugenäht (Abb. 10), sodass die Muskeldecke das Peritoneum gut abschloss. Die Inzision der Haut wurde mit 3-4 Hautklammern geschlossen, damit war die Operation beendet (Abb. 11). Abschließend wurden jedem Tier zur periinterventionellen Infektionsprophylaxe Ampicillin (833mg/Kg Körpergewicht/(in 200µl 0,9% NaCl)) appliziert. Nach dem Ende der Operation wurde die Maus in ihren Käfig zurückgelegt, um dort wieder aus der Narkose zu erwachen.

Die 2. Operation fand eine Woche nach der Ersten statt. Der Operationsvorgang erfolgte nahezu analog zur ersten Operation. Allerdings wurden nach Freilegung und Fixierung der Niere ein Ethicon Perma-Hand 3-0er Faden unter Arteria und Vena renalis und den Ureter geschoben. Diese drei Strukturen wurden mit einem Knoten ligiert und die Niere von den geschlossenen Gefäßen mit einem Skalpell abgetrennt und entfernt. Der Verschluss erfolgte wie oben beschrieben.



Abb. 4



Abb. 5



Abb. 6

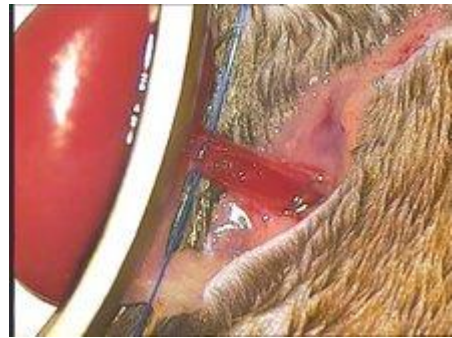


Abb. 7



Abb. 8



Abb. 9



Abb. 10



Abb. 11

3.2.4 Postoperative Beobachtung und Verabreichung der Medikamente

Direkt im Anschluss an die Operationen hatten die Tiere wieder freien Zugang zu Futter und Wasser. Die Haltung der Tiere erfolgte wie präoperativ. Während die Mäuse den ersten Eingriff problemlos überstanden, kam es nach der 2. Operation zum Absterben eines Drittels der Tiere innerhalb der ersten 3 Tage an akutem Nierenversagen. In den ersten Tagen nach der Operation wurden die Tiere deshalb mindestens einmal täglich beobachtet. Bei Entwicklung von Apathie oder Agonie wurden die Tiere zur Vermeidung weiteren Leidens abgetötet. Das Sozialverhalten, Verlangen nach Futter und Wasser und die allgemeine Aktivität ließen eine Beurteilung des Allgemeinzustandes zu. Am dritten Tag nach der zweiten Operation wurde in den Gruppen mit der Medikation begonnen.

Therapie für Gruppe 1 und 2:

normales Leitungswasser.

Therapie für Gruppe 3 und 4:

Um eine Dosis von 15 mg/kg KG/Tag je Maus zu erreichen, wurden 100 mg des sEH-Inhibitors 1471 zunächst in 4 ml 70% Ethanol gelöst und anschließend in 996 ml Leitungswasser gemischt. Bei einer Trinkmenge von 5ml/Tag wurde die erwünschte Dosierung erreicht. Diese Lösung wurde täglich neu angesetzt.

Therapie für Gruppe 5 und 6:

Um eine Dosis von 40 mg/kg KG/Tag je Maus zu erreichen, wurden 240 mg des ACE-Hemmers Ramipril in 4 ml 70% Ethanol gelöst und mit 996 ml Trinkwasser verdünnt. Das Medikament wurde wöchentlich neu angesetzt.

Therapie für Gruppe 7 und 8:

Um eine Dosis von 15 mg/kg KG/Tag zu erreichen, erhielten die Tiere mit Fenbendazolhaltiges Futter (100mg/kg). Bei einer Nahrungsaufnahme von 5 mg/Tag wurde die erwünschte Konzentration erreicht.

Nach der 4. und nach der 8. Therapiewoche mit der entsprechenden Medikation wurden die im Folgenden dargestellten Untersuchungen durchgeführt:

3.2.5 Systolische Blutdruckmessung und Uringewinnung

3.2.5.1 Systolische Blutdruckmessung (BP 2000, Visitech Systems)

Die Ermittlung des Blutdruckes erfolgte nicht invasiv mittels Schwanzplethysmographie am wachen Tier. Hierbei handelt es sich um ein computergestütztes Verfahren, bei dem die Schwanzarterie ähnlich wie bei der Methode nach Riva Rocci komprimiert wird. Die Manschette befindet sich dabei an der Schwanzwurzel. Distal der Manschette wird über eine optische Sonde die Herzfrequenz gemessen. Durch den sich aufbauenden Druck in der Manschette wird die Pulsamplitude verkleinert. Bei einem Abfall der Pulsamplitude auf 20% des Ausgangswertes ist entsprechend der Geräteeinstellung der systolische Blutdruck erreicht.

Während der Messung wurden die Tiere auf eine 37° Grad warme Platte und unter einen länglichen, der Mausform angepassten Metallkäfig gesetzt, aus dem nur der Schwanz herausragte. Auf diese Weise waren die Bewegungsmöglichkeiten der Tiere eingeschränkt und die Messungen konnten gut durchgeführt werden. Alle Gruppen wurden an mindestens 5 Tagen hintereinander zur gleichen Tageszeit (später Nachmittag) gemessen. Es wurden mindestens 2x10 Messungen durchgeführt, die ersten 10 zur Eingewöhnung der Tiere an die ungewohnte Umgebung, die zweiten 10 gingen dann in die Studie mit ein. Alle Messungen fanden in dem Tierstall des Kardiovaskulären Instituts der Physiologie statt, es herrschten konstante äußere Bedingungen.

3.2.5.2 Uringewinnung

Ebenfalls nach 4 und 8 Wochen wurde ein 24 Stunden Sammelurin gewonnen. Dafür wurden alle Tiere in Metabolische Käfige (Tecniplast Deutschland GmbH, Hohenspeißenberg) gesetzt. Diese Käfige ermöglichten es dank eines gitterartigen Bodens, dass sowohl Kot und Nahrungsreste als auch der Urin in am Boden des Käfigs stehende Behälter gesammelt werden konnten. Der Urin, der ausschließlich von Interesse war, über einen sich nach unten hin verjüngenden Kegel in einen Auffangbehälter geleitet. Auf diese

Weise ließen sich saubere Urinproben nach 24 Stunden gewinnen. Die gesammelte Urinmenge wurde gemessen und anschließend bei -20° gelagert.

3.2.6 Biochemische Analysen

3.2.6.1 Messung der Albuminurie

Die Albuminurie wurde mithilfe eines direkten Albumin-ELISA (enzyme linked immunosorbent assay) bestimmt (Dynatech Laboratories, Chantilly, USA). Hierbei macht man sich die Eigenschaft spezifischer Antikörper zu Nutze, die an den nachzuweisenden Stoff (Antigen, hier Albumin) binden. Der Antikörper wird zuvor mit einem Enzym markiert. Die durch das Enzym katalysierte Reaktion dient als Nachweis für das Vorhandensein des Antigens. Das Substrat wird vom Enzym umgesetzt, das Reaktionsprodukt kann üblicherweise durch Farbumschlag, Fluoreszenz oder Chemolumineszenz nachgewiesen werden. Die Signalstärke ist im Allgemeinen eine Funktion der Antigenkonzentration, so dass ELISA auch für quantitative Nachweise verwendet werden kann.

Für den ELISA benötigt man eine 96 Loch Mikrotiterplatte. In einem ersten Schritt wurde die benötigte Anzahl an Löchern mit 100 μl „Coating“-Lösung gefüllt, die den albuminspezifischen Antikörper enthielt. Nach einstündigem Inkubieren bei Raumtemperatur folgte ein Waschvorgang mit der entsprechenden Pufferlösung, der dreimal wiederholt wurde, um alle ungebundenen Antikörper aus den Löchern zu entfernen.

Im Folgenden wurde eine Blocking-Lösung aufgetragen, um Hintergrundflecken zu minimieren.

Nun wurde eine Verdünnungsreihe mithilfe der Standard Lösung angesetzt, zusätzlich wurden 2 weitere Löcher als Leerwert ausschließlich mit derselben Lösung gefüllt. Im nächsten Schritt folgte die Verdünnung der Urinproben mit der Standard Lösung auf 1/1000 (1 μl Urinprobe auf 1.000 μl Standard Lösung) oder 1/10.000. Bei Albuminkonzentrationen, die von dem messbaren Standardbereich abwichen, wurde entsprechend der Abweichung eine 1/10.000 bzw. eine 1/100.000 Verdünnung gewählt. Die verdünnten Urinproben wurden anschließend in die Löcher pipettiert.

Nach 60 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur und 5 Waschvorgängen mit der Waschlösung wurden 100 µl Konjugat Lösung in jedes Loch gegeben. Diese Lösung enthielt Albuminantikörper einer Ziege als zweiten Antikörper des ELISA, die auch für Mäuse-Albumin sensitiv sind. Diese lagerten sich nun an das Antigen (Albumin) an, anschließend folgten Inkubation und Waschvorgang wie im letzten Schritt.

Um jetzt die Farbreaktion hervorzurufen, wurde 100 µl Substrat-Lösung pro Loch dazugegeben. Das an den zweiten Antikörper gebundene Enzym setzte das Substrat daraufhin in das entsprechende Produkt um, sodass es durch die Entstehung des Reaktionsproduktes zu einem Farbumschlag kam. Je nach Albuminkonzentration fand eine Färbung der Proben von hell- bis dunkelblau statt. Dabei handelte es sich um eine inverse Farbreaktion, das heißt je höher die Albuminkonzentration war, desto schwächer war die Blaufärbung. Nach 20 minütiger Inkubation wurde die Enzymreaktion durch die Zugabe von 100 µl Schwefelsäure pro Loch gestoppt. Daraufhin färbten sich die Proben gelb. Die Messung der optischen Dichte wurde abschließend in einem ELISA Plate Reader bei einer Wellenlänge von 450 nm gemessen. Die Erstellung der Standardkurve und die Auswertung der Messwerte der optischen Dichte erfolgten mithilfe der entsprechenden Software. Als Ergebnis wurde die Albuminausscheidung in µg/24Std ermittelt.

3.2.6.2 Messung der EET-, DHET- und HETE-Konzentrationen

Die Messung der EET-, DHET- und HETE-Konzentrationen erfolgte mittels einer LC-MS/MS (engl., Liquid chromatography, mass spectrometry, deutsch: Flüssigkeitschromatographie in Kombination mit einem Massenspektrometer). Das Trennprinzip der LC besteht darin, dass eine zu analysierende Probe in einen Flüssigkeitsstromkreislauf injiziert und in dieser Flüssigkeit, der mobilen Phase, mittels einer Pumpe unter hohem Druck durch eine Trennsäule gepumpt wird. In dieser Trennsäule befindet sich die stationäre Phase, die in diesem Falle aus kleinen Partikeln besteht (Durchmesser ca. 5 µm). Bestandteile der Probe treten dabei mit der stationären Phase in unterschiedliche elektromagnetische Wechselwirkungen und werden abhängig davon verschieden schnell aus der Säule ausgeschwemmt. Die Art und Kombination der beiden Phasen richtet sich nach den chemischen Eigenschaften der zu untersuchenden Substanzen. Die so getrennten Anteile der Probe werden dann weiter in der mobilen Phase in das Massenspektrometer transportiert. Dort finden ein Verdampfen des Lösungsmittels und eine Ionisierung der

Analyten statt. Durch verschiedene elektronische Linsensysteme werden die ionisierten Analyten fokussiert, aufgetrennt und dann am Detektor die verschiedenen Massenübergänge detektiert.

Zur Quantifizierung der zu untersuchenden Analyten wird die Peakarea durch die Peakarea eines mitextrahierten deuterierten Standards dividiert und auf eine im selben Lauf mitgeführte Standardreihe (0.075-50 ng/ml, 12 Punkte) bezogen. Für die Standardreihe wurde hierzu eine quadratische Regression mit einer Wichtung von $1/x^2$ verwendet (Durchgeführt mit der Analyst Software von Applied Biosystems/MDS SCIEX).

Die Messung der EET-, DHET- und HETE Konzentrationen erfolgte in 3 Schritten:

Zunächst mussten die zu bestimmenden Substanzen aus dem Plasma extrahiert werden. Dazu wurden 100 µl Plasma mit 20 µl einer Standardlösung (Mix aus deuterierten EET/HETEs) gemischt. Zu dieser Lösung wurden 500 µl eines organischen Lösungsmittels (Ethylacetat) gegeben und stark gevortext. Nach dem Zentrifugieren dieses Gemisches wurde der Überstand, in dem sich die EETs befanden, in ein neues Eppendorfgefäß transferiert. Die Extraktion wurde anschließend wiederholt und die vereinigten Überstände in einem Vakuumblock unter Stickstoffzufuhr verdampft. Im letzten Schritt der Extraktion erfolgte eine Resuspendierung mit 50 µl eines Methanol/ Wassergemischs (1:1)

Im zweiten Schritt wurde das Auftrennungsverfahren der Flüssigkeitschromatographie genutzt. Es wurden 20 µl in eine Gemini C18 Säule (150 mm x 2 mm, 5 µm) injiziert. Während des Analyseverlaufs mit einer Flussrate von 500 µl/min wurden 2 Eluenten mit folgender Zusammensetzung eingesetzt:

Eluent A: H₂O + 0.0125% NH₃.

Eluent B: CH₃CN + 0.0125% NH₃.

Die Zusammensetzung der Eluenten während des Analyseverlaufs sah wie folgt aus:

Min	A	B
0	85	15
10	60	40
12	10	90
13	10	90
14,5	85	15

18,5	85	15
------	----	----

Im letzten Schritt wurden die untersuchten Analyten in der Massenspektroskopie quantifiziert. Das Gerät war dafür auf MRM (Multi reaction mode) eingestellt, in dem pro Sekunde ca. 40 Massenübergänge gemessen werden können. Die zu untersuchenden Proben wurden ionisiert (hier durch Abspaltung eines Protons, "negative mode"), fokussiert und detektiert. Da jeder Analyt seine spezifische Masse, Retentionszeit und ein spezifisches Tochterfragment hat, ließ sich beim Vergleich mit dem internen Standard jeder einzelne Analyt gut quantifizieren.

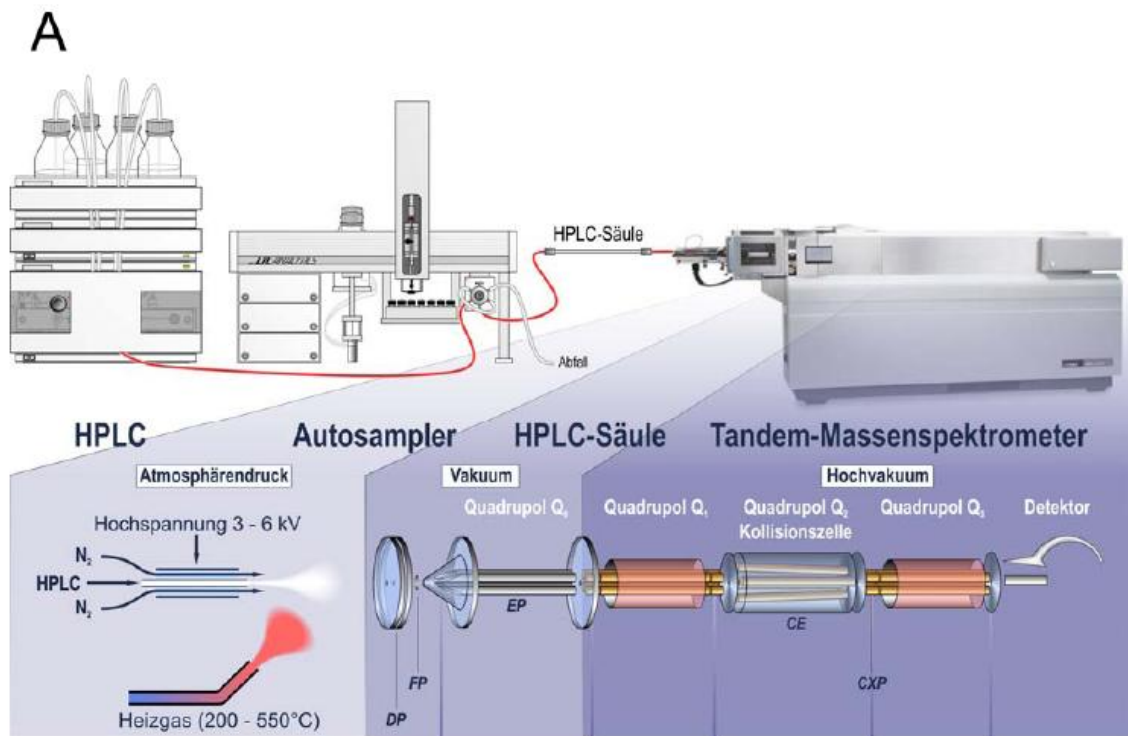


Abb. 12. Aufbau und Funktionsweise eines LC-MS/MS-Systems auf Basis eines API 4000-Tandem-Massenspektrometers. A. Das System besteht aus den vier Teilen HPLC, Autosampler, HPLC-Säule und Massenspektrometer. Das Tandem-Massenspektrometer kann weiter in verschiedene Teilbereiche untergliedert werden. Die Ionisierung der Analyten und Verdampfung des HPLC-Lösungsmittels erfolgt im Elektrospray-Interface unter Atmosphärendruck mit Hilfe eines heißen Stickstoffstroms. Verschiedene elektrische Linsensysteme fokussieren die ionisierten Analyten in den Hochvakuumbereich des Massenspektrometers, wo sie aufgrund ihres Masse-zu-Ladungsverhältnisses von Quadrupolen aufgetrennt werden. Quelle: Ronald Schmidt, Dissertation zum Thema: LC-MS/MS Analyse von Eicosanoiden

3.2.6.3 Western-Blot-Analyse

Als Western Blot bezeichnet man die Übertragung (engl. *Blotting*) von Proteinen auf eine Trägermembran, wo sie anschließend über unterschiedliche Reaktionen nachgewiesen werden können.

Vor dem eigentlichen Western Blot wird ein Proteingemisch mit Hilfe einer Gel-Elektrophoresetechnik in einer Trägermatrix (SDS-PAGE) entsprechend der Größe und Ladung in einem elektrischen Feld aufgetrennt. Dies geschieht in einem Gel (Polyacrylamid-Gel), in dem sich der Ladung und Größe entsprechend Proteinbanden bilden.

Beim Western Blot wird anschließend ein senkrecht zum Polyacrylamid-Gel gerichtetes elektrisches Feld angelegt. Somit wandern die Proteine aus dem Gel auf eine Nitrocellulosemembran, an deren Oberfläche sie aufgrund hydrophober Wechselwirkungen haften bleiben. Dabei bleibt das Muster der elektrophoretischen Auftrennung erhalten - die Proteine sind nun aber für weitere Methoden zugänglich (z. B. Antikörper-Bindung). Nach diesem Vorgang kann das an den Proteinen angelagerte SDS ausgewaschen werden. Daher können die Proteine renaturieren und teilweise ihre Sekundär- und Tertiärstruktur wieder einnehmen, nicht aber ihre Quartärstruktur.

In der Versuchsreihe wurde der Western Blot zum Nachweis der sEH in der Niere der Mäuse angewendet.

Zur Aufbereitung der Proteine und deren anschließenden Auftrennung wurde nach folgendem Protokoll gearbeitet:

Zur Proteinaufarbeitung wurden zunächst die gefrorenen Nieren gemörsert. Anschließend wurde jeweils eine Spatelspitze in Lysepuffer lysiert und gepottert. Diese Mischung wurde jeweils in ein für jede Probe vorbeschriftetes Eppendorfgefäß pipettiert und kurz gevortext. Nach ca. 10-20 min. wurden sie dann für wiederum 10 min. zentrifugiert (bei 4°C und 13 000 Umdrehungen) und der Überstand anschließend in frische Gefäße überführt. Das Pellet wurde verworfen.

Zur Proteinbestimmung wurde je Probe ein Eppendorfgefäß mit je 200 µl bidest. H₂O vorbereitet und mit 2 µl der jeweiligen Probe gemixt. Auf einer Mikrotiterplatte wurde die erste Reihe mit einer Standardreihe aus Rinderserumalbumin-Lösung (jeweils 80 µl einer Standardlösung von → A1: Leerwert (Wasser) , B1: 2,5 µg Protein, C1: 5 µg Protein, D1:

10 µg Protein, E1: 20 µg Protein, F1: 30 µg Protein, G1: 40 µg Protein, H1: 50 µg Protein) versehen und ab der zweiten Reihe jeweils 80 µl der vorbereiteten Probenverdünnung (200 µl Wasser und 2 µl Probe) aufgetragen. Zuletzt wurde in jedes Well noch 200 µl Bradfordlösung mit einer Multipette gegeben. Mit Hilfe eines Elisa-Gerätes konnten dann die Konzentrationen der einzelnen Proben bei 510 nm photometrisch bestimmt werden.

Als nächstes mussten die SDS-Gele zur Polyamidgelelektrophorese gegossen werden. Der elektrophoretische Transfer fand entsprechend dem Wet-Verfahren (Tankblot) statt.

Je Apparatur gab es zwei Glasplatten (eine größere und eine kleinere), die zuvor mit Alkohol gereinigt und anschließend durch je zwei Spacer (links und rechts am Rand) voneinander getrennt aufeinandergelegt wurden (die kleinere Platte auf die größere). Die Dicke der Spacer entschied darüber, wieviel µl jeweils später in jede Tasche maximal gegeben werden konnte (dünne Spacer: ca. 40 µl, dicke Spacer: ca. 60 µl). Dies wurde dann in die Apparatur mit der größeren Platte nach innen eingebaut. Die Spacer mussten ganz am Rand und die Platten unten luftdicht abschließen. Dann wurde das Trenngel gegossen (pro Apparatur 1.5 x die Rezeptvorgabe) und mit einer 5 ml-Pipette ca. 5 ml zwischen die zwei Platten gegossen. Um es luftdicht abzudichten (damit es polymerisieren konnte) wurde direkt 1 ml Isopropanol daraufgegeben. Nach etwa 15 Minuten wurde das Isopropanol wieder abgegossen, das Sammelgel dazugegeben und die Kämme für die Probenaschen eingesetzt. Dies musste dann wieder 30 min. – 1 Std. polymerisieren. Das Sammelgel dient bei der Elektrophorese dem Sammeln der Proteine auf einer Startlinie.

Zwischenzeitlich wurde die Apparatur für die Elektrophorese vorbereitet: die polymerisierten Gele wurden in die Apparatur eingebaut (diesmal die kleinere Platte nach innen) und alles mit 1 x Laufpuffer aufgefüllt. Nachdem die Taschen mit einer Hamilton-Spritze mit Hilfe des Puffers gereinigt worden waren, konnten die Proben in die Taschen pipettiert werden, nachdem sie für etwa 10 min. bei 95°C mit dem Probenpuffer in einem Verhältnis von 2:1- Probe:Probenpuffer aufgeköcht und das Kondenswasser wieder herunterzentrifugiert wurde. Dabei wurde die erste Tasche mit einem größeren Standard (etwa 3 µl) beladen („BRL BENCHMARK Prestained Protein Ladder“). Zu Beginn der Elektrophorese lief das Gel bei 25 mA für ca. 30 min. bis die Proteine in das Gel eingelaufen waren. Dann wurde der Strom auf 35-45 mA für 35 – 70 min. erhöht.

Gegen Ende der Gelelektrophorese wurde parallel die Transfervorrichtung vorbereitet. Dabei wurden zwei große Schüsseln bereitgestellt, eine mit Wasser und die andere mit

Transferpuffer gefüllt. In der Schüssel mit dem Transferpuffer wurden die für den Transfer notwendigen Schwämme aufgeweicht. Die Nitrocellulosemembranen wurden beschriftet und für 10-15 min. in eine kleine Schüssel mit Wasser gelegt.

Als nächstes wurde eine Kiste mit Eis gefüllt und die Transferapparatur darin vorgekühlt. Dann konnten die Gele aus den Platten herausgelöst und nach folgendem Schema für den Transfer vorbereitet werden: 2 Schwämme (gut mit Transferpuffer durchtränkt und Luftblasen-frei) → Pappe → Gel → Membran → Pappe → 2 Schwämme. Dieser Komplex wurde in die Transferkassette gegeben, diese geschlossen und mit der dunklen/grauen Seite in Richtung der dunklen Seite der Transferapparatur eingebaut.

Dann lief der Transfer bei 120 Volt (bis minimal 100 Volt) und 250 mA/ App. für 60-70 min. Nach dem Transfer wurden die Membranen in den in Wasser gelösten Proteinfarbstoff Panceaus eingelegt und danach nicht gebundener Farbstoff dreimal mit frischem monodest. Wasser gewaschen, entfernt und letztendlich ein Photo von den Membranen und der Proteinverteilung (Markierung der Referenzbanden mit einem roten Stift bei 175, 83, 62, 47,5, 32,5, 25, 16,5, 6,5 kDa, wobei letztere je nach gesuchter Proteingröße gelegentlich nicht mehr vorhanden waren) gemacht.

Die Entfärbung der Membranen erfolgte in TBST-Puffer sowie deren Inkubation in einem sogenannten „Blocking-Puffer“ (meist vorbereiteter TBST-Puffer mit 3% Rinderserumalbumin (BSA)) für ca. 40 min. bei Raumtemperatur, welches dazu diente, unspezifische Proteinbindungsstellen abzusättigen. Anschließend wurden die Membranen über Nacht bei 4°C (bzw. 2 h bei Raumtemperatur) im Erst-Antikörper (polyklonaler sEH Antikörper aus rabbit Serum, welcher in einer 1:2.000-Verdünnung in TBST-Puffer mit 3% BSA angesetzt wurde) geschüttelt. Um nicht gebundene Antikörper zu entfernen, wurden die Membranen anschließend fünfmal mit TBST-Puffer über insgesamt 10 min. unter Schütteln bei RT gewaschen und zuletzt noch mal für 10 min. mit Waschpuffer ohne Tween bei RT unter Schütteln gewaschen. Nun konnte zur Detektion des Erst-Antikörpers der Blot mit dem Licor Zweit-Antikörper, der gegen den Erst-Antikörper gerichtet war (1:15.000 mit BSA verdünnt und davon je Schale bzw. Membran ca. 15-20 ml), für eine Stunde bei Raumtemperatur auf die Membran gegeben werden. Danach folgten die gleichen Waschvorgänge wie nach dem Erst-Antikörper. Jetzt konnte das gesuchte Protein mittels Licorscan sichtbar gemacht werden. Zur semiquantitativen Bestimmung der

relativen Proteinmengen erfolgte die Auswertung der Banden auf dem Licorscan densitometrisch.

Sollte die Membran mit einem weiteren gegen ein anderes Protein gerichteten Antikörper behandelt werden, wurde diese zunächst bei 50°C in einem „Stripping-Puffer“ für eine halbe Stunde inkubiert. Anschließend wurde der Blot 10x mit TBST-Puffer gewaschen und in TBST-Puffer mit 3% BSA geblockt. Der alternative Erst-Antikörper konnte dann auf die Membran gegeben werden.

3.2.6.4 Quantitative Polymerase Kettenreaktion (qPCR)

Die Kontrolle der Genexpression der löslichen Epoxidhydrolase (EPHX2, sEH), der Cytochrome CYP2C38 und CYP2C40 sowie der Phospholipase A₂ in den Nieren 5/6-nephrektomierter Mäusen des SV129 Stammes auf mRNA-Ebene erfolgte mittels quantitativer Polymerasekettenreaktion. Mit dem gleichen Verfahren wurden zusätzlich die mRNA Konzentrationen der 5-Lox, 12-Lox und 15-Lox bestimmt. Insgesamt waren für die Kontrolle der Genexpression 4 Schritte notwendig:

- Isolierung der RNA
- Durchführung der reversen Transkription
- Semiquantitative Echtzeit-Polymerasekettenreaktion (RTQ-PCR)
- Agarosegelelektrophorese

RNA-Präparation mit dem Absolutely RNA Miniprep Kit (Stratagene)

Zunächst wurden die Nieren in flüssigem Stickstoff gemörsert und eine Spatelspitze Mörserstaub in 350 µl Lysis Buffer + 2,5 µl β-Mercaptoethanol gelöst.

Anschließend wurden die Proben in Lysis Buffer 15 min bei 4 °C geschüttelt und auf blauen Prefilter Spin Cup dekantiert. Es folgte eine 5 minütige Zentrifugation bei 14.000 rpm und 4 °C.

Das Filtrat wurde anschließend mit dem gleichem Volumen (= 350 µl) 70 % Ethanol gemischt, circa 5 sek. gevortext und auf weißen RNA Binding Spin Cup (mit neuem 2 ml-Reaktionsgefäß) dekantiert. Im Anschluss erfolgte eine Zentrifugation für 60 s bei 14.000 rpm und 4 °C, bevor das Filtrat verworfen wurde. Im nächsten Schritt wurden 600 µl Low-

Salt Wash Buffer auf die Säule gegeben und 60 s bei 14.000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Das Filtrat wurde anschließend verworfen.

Es folgte der DNase-Schritt: Dafür wurde 2 min bei 14.000 rpm und 4 °C zur Trocknung der Membran zentrifugiert, bevor 50 µl DNase Digestion Buffer + 5 µl RNase free DNase I auf die Säule gegeben und circa 45 min bei 37 °C inkubiert wurde. Anschließend erfolgte die Gabe von 600 µl High-Salt Wash Buffer auf die Säule und eine Zentrifugation für 60 s bei 4 °C und 14.000 rpm. Das Filtrat wurde wieder verworfen. Im nächsten Schritt wurden 600 µl Low-Salt Wash Buffer auf die Säule gegeben und 60 s bei 4 °C und 14.000 rpm zentrifugiert, das Filtrat wurde anschließend verworfen. Dieser letzte Schritt wurde mit 300 µl Low-Salt Wash Buffer und 2minütiger Zentrifugation bei 4 °C und 14.000 rpm wiederholt.

Für die Elution wurde das RNA Binding Spin Cup auf ein neues 1,5 ml-Reaktionsgefäß gesetzt, je 15 µl Elution Buffer (auf 60 °C erwärmt) auf die Säule gegeben und circa 2 min bei RT inkubiert. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation für 2 min. bei 14.000 rpm und 4 °C. Die Elution wurde am Anschluss mit gleicher Menge Elution Buffer wiederholt und Säule verworfen.

Abschließend wurde die Konzentration und Reinheit der RNA am Nanodrop ND-1000 (Peqlab) bestimmt. Die Aufbewahrung der RNA erfolgte bei -80 °C.

Reverse Transkription (RT) mit Superscript III von Invitrogen im Robocycler (Stratagene):

Die Reverse Transkription der isolierten RNA erfolgte mittels Superscript III Reverse Transkriptase von Invitrogen. Das Ansatzvolumen betrug 20 µl. Anschließend wurden die Ansätze mit Aqua bidest. auf 2 ng·µl⁻¹ transkribierte RNA aufgefüllt.

Das Ansatzvolumen betrug 20 µl und war wie folgt zusammengesetzt:

5 ng	RNA
2,0 µl	Random PdN6-Primer (25 µg·ml ⁻¹)
1,0 µl	dNTP-Mix (10 mM je dNTP)
ad.	Aqua bidest. (Gesamtansatz 20 µl)

Es folgte die Inkubation für 5 min bei 65 °C im Robocycler, dann wurde die beschriebene Zusammensetzung für mindestens 1 min. auf Eis gelegt. Anschließend wurden folgende Substanzen dazugegeben:

4,0 µl	5x First Strand Buffer
1,0 µl	DTT (0,1 M)
0,5 µl	Superscript III Reverse Transkriptase (200 u·µl ⁻¹)

Es erfolgte eine 5 minütige Inkubation bei Raumtemperatur, anschließend die Reverse Transkriptase Reaktion im Robocycler mit folgender Zeit- und Temperaturreihenfolge:

50 °C	60 min
70 °C	15 min
6 °C	∞

Abschließend wurden die Ansätze mit Aqua bidest. auf 2 ng·µl⁻¹ transkribierte RNA aufgefüllt.

Semiquantitative Echtzeit-Polymerasekettenreaktion (RTQ-PCR) im Mx4000 (Stratagene) für EPHX2:

Das Ansatzvolumen betrug 25 µl und war wie folgt zusammengesetzt:

5,0 µl	cDNA (= 10 ng transkribierte RNA)
12,5 µl	Absolute QPCR SYBR Green Mix (Thermo Scientific)
0,5 µl	ROX Reference Dye (1:200 in Aqua bidest., Thermo Scientific)
0,5 µl	Forward Primer (10 µM)
0,5 µl	Reverse Primer (10 µM)
6,0 µl	Aqua bidest.

Mit dieser Zusammensetzung wurde folgendes Programm durchgeführt:

95 °C	15 min	Initiale Denaturierung
95 °C	30 s	Denaturierung

55 °C	30 s	Anlagerung	40 Zyklen
72 °C	30 s	Elongation	
95 °C	60 s		

Anschließend wurde eine Dissoziationskurve bei aufsteigenden Temperaturen (55 °C bis 95 °C) erstellt.

Folgende Primer und Nummern wurden verwendet:

EPHX2 = lösliche Epoxidhydrolase, #1 + #2

EEF2 = Eukaryotischer Translationselongationsfaktor 2, #3 + #4

Die entsprechenden Sequenzen sind weiter unten aufgeführt.

RTQ-PCR im Mx4000 (Stratagene) für CYP2C38, CYP2C40, PLA₂, 5-Lox, 12-Lox und 15-Lox

Die RTQ-PCR für CYP2C38 und CYP2C40 lief im Wesentlichen ähnlich ab wie für EPHX2. Hier der genaue Ablauf:

Das Ansatzvolumen betrug 25 µl und war wie folgt zusammengesetzt:

5,0 µl	cDNA (= 10 ng transkribierte RNA)
12,5 µl	Absolute QPCR Mix (Thermo Scientific)
0,5 µl	ROX Reference Dye (1:200 in <i>Aqua bidest.</i> , Thermo Scientific)
0,5 µl	Forward Primer (10 µM)
0,5 µl	Reverse Primer (10 µM)
0,5 µl	Sonde
5,5 µl	<i>Aqua bidest.</i>

Mit dieser Zusammensetzung wurde folgendes Programm durchgeführt:

95 °C	15 min	Initiale Denaturierung	
95 °C	30 s	Denaturierung	
55 °C	30 s	Anlagerung	40 Zyklen
72 °C	30 s	Elongation	
95 °C	60 s		

Verwendete Primer und Sonden

CYP2C38 = #6 + #7, Sonde: #5

CYP2C40 = #8 + #9, Sonde: #10

Cytosolische Phospholipase A2, Gruppe IVA (Calcium-dependent),

Pla2g4a, GeneID: 18783 = #11 + #12

5-Lox = #13 + #14

12-Lox = #15 + #16

15-Lox = #17 + #18

EEF2 = Eukaryotischer Translationselongationsfaktor 2, #44 + #45

Sequenzen der verwendeten Primer und Sonden:

#1: 5'-GAACATGAGTCGGACTTTCAAAGCTTCTTC-3'

#2: 5'-CCACAGTCCTCAATGTGTCCCCTTTTCAGG-3'

#3: 5'-GACATCACCAAGGGTGTGCAG-3'

#4: 5'-GCGGTCAGCACACTGGCATA-3'

#5 5'-Cy5-ATCAGAGCTTCCTTCACTGCTTCATACCCA-3'

#6: 5'-CCCCTCCTTTCCCGATTAT-3'

#7: 5'-CAGAAAACCTCCTCCCATGA-3'

#8: 5'-AGGTCCAGCGGTACATTGAC-3'

#9: 5'-CACAAATCCGTTTTCTGCT-3'

#10: 5'-FAM-TTCATCCTCAAGGGAACACAGGTAA-3'

#11: 5'-GTTCTACGTGCCACCAAAGTAACC-3'

#12: 5'-TCCATGACGTAGTTGGCATCCATC-3'

#13: 5'-CGGCTTCCCTTTGAGTATTGATGC-3'

#14: 5'-CAGGAACTGGTAGCCAAACATGAG-3'

#15: 5'-GGTCTGCAACCTCATCACAGTTC-3'

#16: 5'-CCAGCAGTAGGTCTGTTGTCTTTC-3'

#17: 5'-GCACTTGGTGGCTGAGGTCTTTG-3'

#18: 5'-GCTCCAGCTTGCTTGAGAAGATCC-3'

Agarosegelelektrophorese:

Im Anschluss an die QPCR erfolgte die Agarosegelelektrophorese: 2,5 % Agarose in TAE-Puffer. Gellauf bei 90 V in TAE-Puffer, anschließend 15 min. Inkubation in EtBr-Lösung ($1\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) und Dokumentation mit dem Intas UV-System und Intas Gel Jet Imager.

3.2.7 Tötung und Organentnahme

Nachdem die Behandlungsdauer von 8 Wochen beendet war, wurden die Tiere in den Räumlichkeiten des Kardiovaskulären Instituts getötet. Dafür wurden sie zunächst in einem mit etwas Isofluran gefüllten Behälter narkotisiert. Nach Prüfung einer ausreichenden Narkosetiefe wie beschrieben 2.2.3.1 wurden Abdomen und Thorax eröffnet und das Herz mit einer Kanüle punktiert. Durch Exsanguinierung trat daraufhin nach kurzer Zeit der Tod ein. Das Blut wurde dabei in einem Eppendorf-Röhrchen aufgefangen, dann 10 min bei 800 U/min zentrifugiert, so dass sich das Serum von den korpuskulären Anteilen des Blutes trennte und gut abpipettieren ließ. Die mit Serum gefüllten 1,5 ml Eppendorfröhrchen wurden dann in Flüssigstickstoff gefroren und bis zur Messung der Konzentrationen der verschiedenen Epoxyeicosatriensäuren (EETs) und ihrer Derivate bei -80°C gelagert.

Nach dem Ausbluten erfolgte die Organentnahme von Herz, Niere und Aorta.

Herz:

Zunächst wurde das Herz von den umgebenden Strukturen frei präpariert und am Eintritt bzw. Austritt der großen Gefäße von diesen getrennt und aus dem Thorax entfernt. Anschließend wurde das Organ in einer mit PBS gefüllten Petrischale auf Eis gelagert und von Gewebsresten befreit. Dann wurde das Organ gewogen und anschließend in einem 1,5 ml Eppendorf Röhrchen in Flüssigstickstoff gefroren.

Niere:

Nach dem Entfernen der abdominalen Organe (Darm, Milz, Leber, Pankreas usw.) konnte der verbleibende Rest Nierengewebe gut beurteilt werden. Dabei wurde besonders darauf geachtet, ob der obere Pol tatsächlich nekrotisch war und ob der verbleibende, funktionstüchtige Teil der Niere ungefähr die Größe eines Drittels der Ursprungsgröße der Niere hatte. War dies nicht der Fall, wurden die Tiere aus dem Versuch ausgeschlossen. Der Nierenrest wurde dann von den Gefäßen und dem Ureter abgetrennt. Anschließend wurde das Organ in einer mit PBS gefüllten Petrischale auf Eis gelagert und von Gewebsresten befreit. Es folgte das Wiegen des Organrestes bzw. beider Nieren bei den sham Gruppen. Abschließend wurde der Nierenrest der 5/6 Nx Tiere in einer Petrischale mittels Sagittalschnitt in 2 Hälften geteilt. Für die weitere histologische Aufarbeitung wurde die eine Hälfte für 24 Stunden in Paraformaldehyd (PFA) fixiert und anschließend in

70%ige Ethanol Lösung überführt. Die andere Nierenhälfte wurde in Flüssigstickstoff gefroren. Die beiden kompletten Nieren der sham Gruppen wurden wie die Nierenhälften der 5/6 Nx Gruppen gelagert.

Aorta:

Nachdem alle Organe aus dem Thorax und dem Abdomen herauspräpariert waren, konnte die Aorta vom abdominellen über den thorakalen Teil bis zum Aortenbogen freipräpariert und von der Wirbelsäule getrennt werden. Anschließend wurde das Organ in einer mit PBS gefüllten Petrischale auf Eis gelagert und von Gewebsresten befreit. Die Aorta wurde abschließend in einem Eppendorf-Röhrchen in Flüssigstickstoff gefroren.

Die Lagerung von Herz, Niere und Aorta erfolgte in einem – 80 Gefrierschrank in den Räumlichkeiten des Instituts.

3.2.8 Nierenhistologische Auswertung

Die histologische Auswertung der Organe erfolgte extern in der Pathologie der Uniklinik Erlangen unter der Leitung von Frau Prof. Amann. Dafür wurden semiquantitative, morphologische und stereologische Messungen vorgenommen. Alle Messungen wurden von 2 unterschiedlichen Untersuchern unabhängig voneinander verblindet durchgeführt.

Für die histologische Auswertung der Organe wurden zunächst Paraffinschnitte angefertigt. Die renale Schädigung wurde anhand von Glomerulosklerose, tubulointerstitiellem- und vaskulärem Schaden beurteilt.

Um den Grad der Sklerose der Glomeruli als ein Index der Progression zu beurteilen, wurde eine PAS Färbung der Paraffinschnitte durchgeführt. Anschließend wurden 100 Glomeruli pro Tier mittels eines semiquantitativen Bewertungssystems unter einem Lichtmikroskop mit einer 400 fachen Vergrößerung beurteilt. Der Grad der Glomerulosklerose wurde auf einer Skala von 0 bis 4 angegeben für jedes Glomerulum angegeben. Dabei hatten die Zahlen folgende Bedeutung:

Grad 0: normaler Glomerulus.

Grad 1: beginnende mesangiale Erweiterung/Verdickung der Basalmembran und/oder abnormales Lumen der Kapillaren.

- Grad 2: leichte/moderate segmentale Hyalinisierung/Sklerose umfasst weniger als 50% des Glomerulums.
- Grad 3: diffuse glomeruläre Hyalinisierung/Sklerose umfasst mehr als 50% des Glomerulums.
- Grad 4: diffuse Glomerulosklerose mit totaler Obliteration des Glomerulums

Tubulointerstitielle Veränderungen (tubuläre Atrophie, Dilatation, interstitielle Inflammation

und Fibrose) als Index des interstitiellen und vaskulären Schadens (leicht/moderat/schwere Wandverdickung, Lumen Obliteration, fibrinoide Nekrose) wurden mithilfe desselben Semiquantitativen Bewertungssystems (Grad 0-4) ausgewertet. Das Endergebnis entsprach dem Durchschnittsergebnis aller 100 bewerteten Glomeruli.

3.2.9 Statistische Auswertung

Die Ergebnisse werden als Mittelwert +/- Standardfehler (S.E.M.: Standard Error of the Mean) von n verschiedenen Experimenten angegeben. Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe des Student's t-Test mit Bonferoni-Korrektur beziehungsweise der ANOVA-Methode bei multiplen Vergleichen. Ein Wert von $p < 0.05$ wurde als statistisch signifikant angesehen. Die Überlebensraten wurden nach Kaplan-Meier berechnet.

4 Ergebnisse

4.1 Überlebensrate

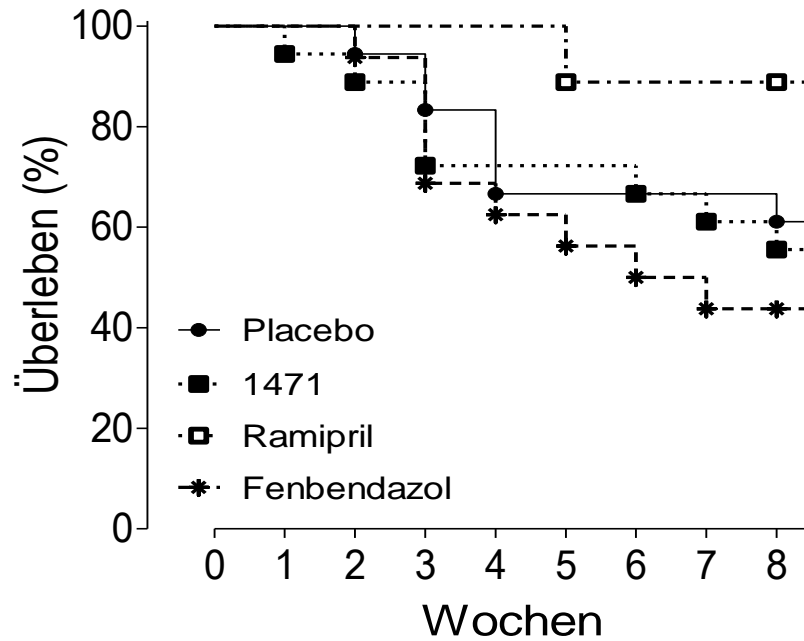


Abb. 13. Überlebensrate nach Kaplan-Meier der verschiedenen Behandlungsgruppen nach 5/6 Nephrektomie

Die 5/6 Nx führte in den Gruppen Placebo, 1471 und Fenbendazol zu keinen signifikanten Unterschieden in der Überlebensrate (Placebo: 57,2%, 1471: 50%, Fenbendazol: 43,7%). Die Gabe von Ramipril verbesserte die Überlebensrate (88,9 %).

4.2 Entwicklung des Körper- und des Herzgewichts

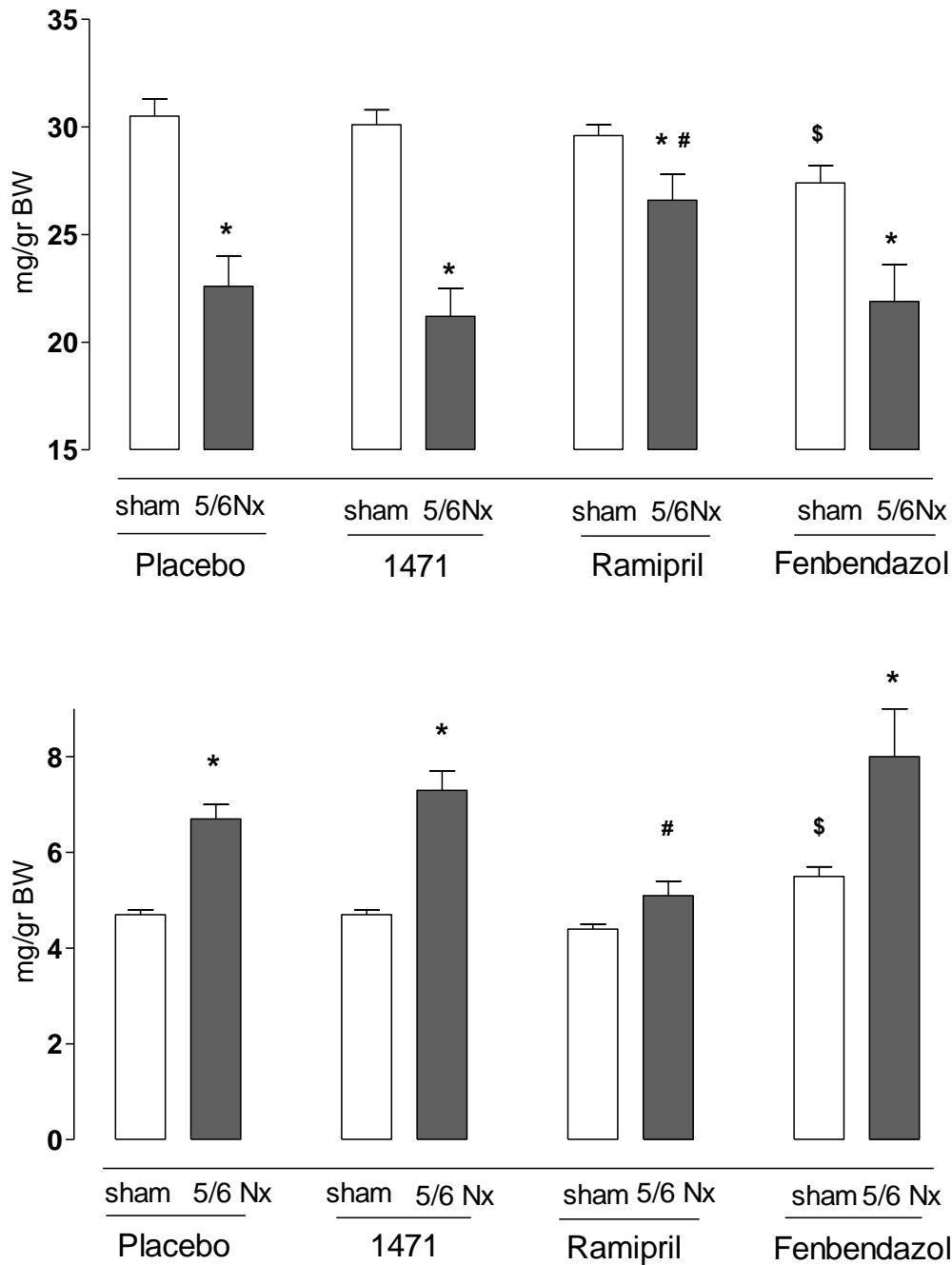


Abb. 14. Entwicklung des Körpergewichts und des relativen Herzgewichts nach achtwöchiger Versuchsdauer; * $p < 0,05$ vs. sham; # $p < 0,05$ vs. Placebo, 1471 und Fenbendazol, \$ $p < 0,05$ vs. Placebo, 1471, Ramipril

Das Körpergewicht der Tiere vor der Operation betrug 26-32g und unterschied sich nicht signifikant. Die 5/6 Nx-Tiere wiesen einen signifikanten Verlust des Körpergewichts während des 8 wöchigen Versuchsablaufs auf (Placebo: $22,6 \pm 0,8g$ vs. $30,5 \pm 1,4g$ $p < 0,05$). Analog dazu entwickelten die 5/6 Nx-Tiere ein signifikant höheres relatives

Herzgewicht (im Verhältnis zum Körpergewicht) als die korrespondierende sham-Gruppe ($6,7 \pm 0,3$ mg/gr KG vs. $4,7 \pm 0,1$ mg/gr KG, $p < 0,05$).

Bei den 5/6 Nx-Tieren ließ sich in der Ramipril-Gruppe eine signifikant geringere Reduktion des Körpergewichts im Vergleich zu den anderen Gruppen nachweisen (Ramipril: $26,6 \pm 1,2$ g vs. Placebo: $22,6 \pm 0,8$ g, 1471: $21,2 \pm 1,2$ g, Fenbendazol: $21,9 \pm 1,7$ g, $p < 0,05$). Analog dazu war unter Ramipril Therapie das Herzgewicht signifikant niedriger als in den restlichen 5/6 Nx-Gruppen (Ramipril: $5,1 \pm 0,3$ mg/gr KG vs. Placebo: $6,7 \pm 0,3$ mg/gr KG, 1471: $7,3 \pm 0,4$ mg/gr KG, Fenbendazol: $8,0 \pm 1,0$ mg/gr KG, $p < 0,05$).

4.3 Entwicklung des Blutdrucks

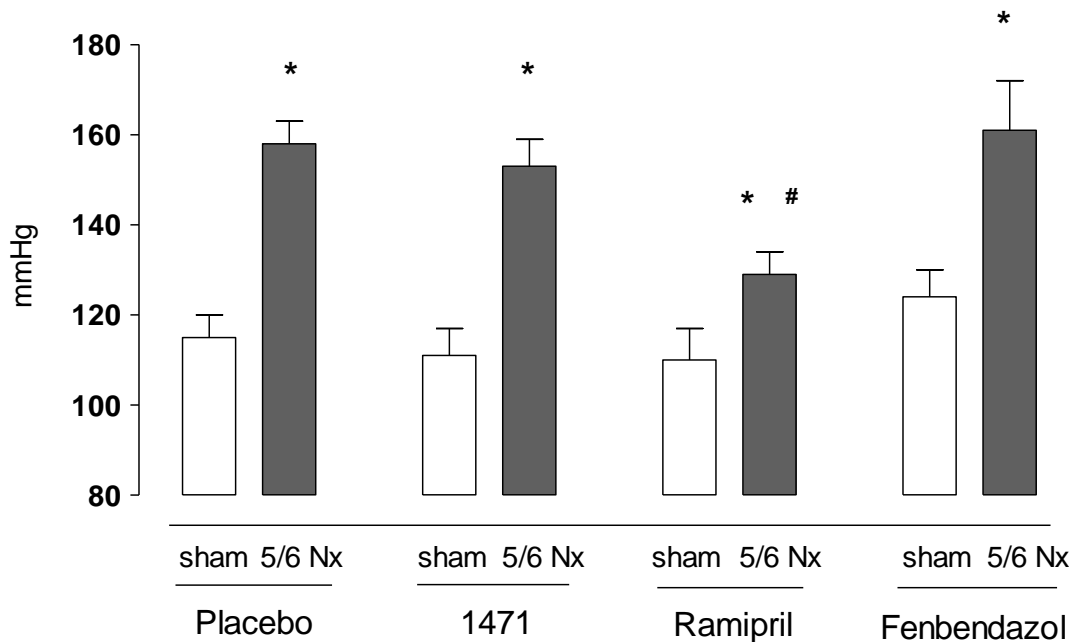


Abb. 15. Systolischer Blutdruck nach achtwöchiger Versuchsdauer. * $p < 0,05$ vs. sham, # $p < 0,05$ vs. Placebo, 1471, Fenbendazol

Die 5/6 Nx-Tiere entwickelten nach achtwöchiger Versuchsdauer einen signifikanten arteriellen Hypertonus im Vergleich zu den sham-Tieren (158 ± 5 mmHg vs. 115 ± 5 mmHg, $p < 0,05$). Bei den sham-operierten Tieren kam es zu keinem Blutdruckanstieg.

Die 5/6 Nx-Tiere entwickelten dagegen unabhängig von der Therapie einen im Vergleich zur jeweiligen sham-Gruppe signifikanten Blutdruckanstieg (1471: 153 ± 6 mmHg vs. 111 ± 6 mmHg, Ramipril: 129 ± 5 mmHg vs. 110 ± 7 mmHg, Fenbendazol: 155 ± 10 mmHg vs. 124 ± 10 mmHg, $p < 0,05$).

Bemerkenswert war, dass die 5/6 Nx-Tiere unter Ramipril Therapie einen signifikant niedrigeren Blutdruck entwickelten als die 5/6 Nx-Tiere unter Placebo-, 1471- und Fenbendazol Therapie (Ramipril: 129 ± 5 mmHg, Placebo: 158 ± 5 mmHg, 1471: 153 ± 6 mmHg, Fenbendazol: 155 ± 10 mmHg, $p < 0,05$). Die Gabe von 1471 oder Fenbendazol führte bei den 5/6 Nx-Tieren zu keinen signifikanten Veränderungen im Vergleich zur Placebo-Gruppe.

Die nach vier Wochen gemessenen Werte wichen nicht signifikant von den dargestellten nach acht Wochen gemessenen Werten ab und sind deshalb hier nicht aufgeführt.

4.4 Entwicklung der Albuminurie

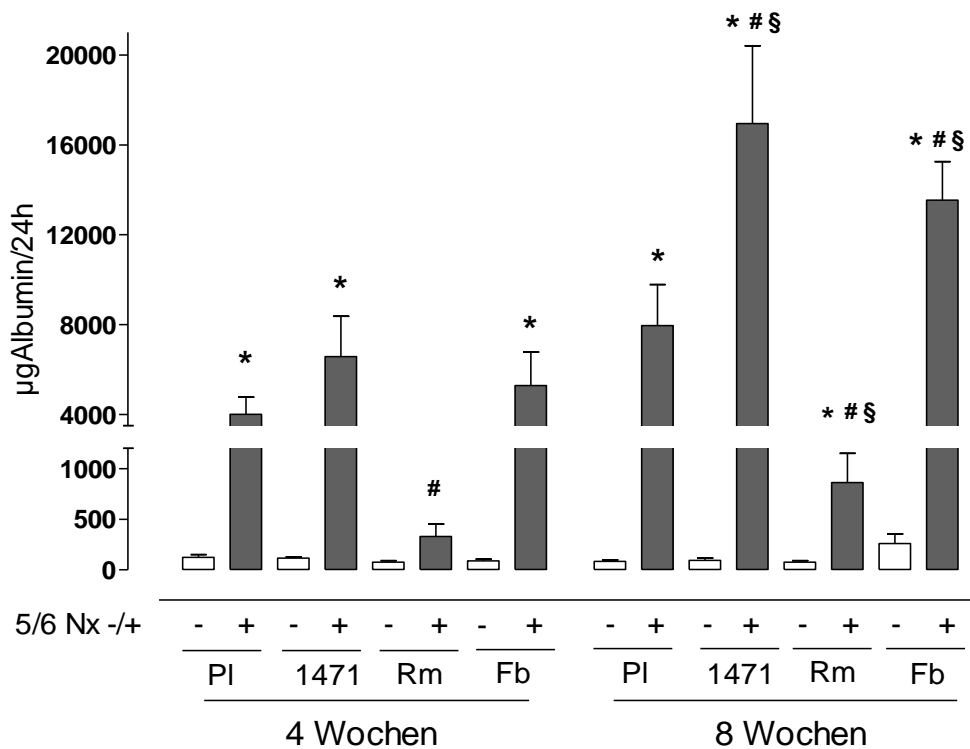


Abb. 16. Albuminurie der verschiedenen Gruppen nach 4- und nach 8 Wochen. PI = Placebo, Rm = Ramipril, Fb = Fenbendazol * $p < 0,05$ vs. sham, # $p < 0,05$ vs. Placebo § $p < 0,05$ vs. 4 Wochen

Die 5/6 Nephrektomie führte bei Placebo behandelten Tieren sowohl nach vier- als auch nach acht Wochen zu einem signifikanten Anstieg der Albuminurie verglichen mit der entsprechenden sham-operierten Gruppe (Werte nach vier Wochen: $4005,2 \pm 762$ $\mu\text{g}/24\text{h}$ vs. $123,7 \pm 7,3$ $\mu\text{g}/24\text{h}$, $p < 0,05$, nach acht Wochen: $7953,1 \pm 1833,8$ $\mu\text{g}/24\text{h}$ vs. $83,7 \pm 14$ $\mu\text{g}/24\text{h}$, $p < 0,05$). Die sham-operierten Tiere entwickelten in keiner der Behandlungsgruppen eine Albuminurie.

Vergleichbar mit der Entwicklung des arteriellen Hypertonus entwickelten alle 5/6 Nx-Tiere unabhängig von der Therapie bereits nach 4 Wochen eine Albuminurie, die nach 8 Wochen noch gesteigert war. Nach vier Wochen gab es keine signifikanten Unterschiede zwischen den 5/6 Nx-Tieren der verschiedenen Behandlungsgruppen. Nach 8 Wochen wiesen die mit 1471 und Fenbendazol behandelten 5/6 Nx-Tiere eine signifikant höhere Albuminurie als die Placebo Gruppe auf (1471: $16.942,1 \pm 3467,2 \mu\text{g}/24\text{h}$, Fenbendazol: $13543 \pm 1706 \mu\text{g}/24\text{h}$, Placebo: $7953,1 \pm 1833,8 \mu\text{g}/24\text{h}$, $p < 0,05$). Analog zu den Ergebnissen der Blutdruckmessung führte die Behandlung mit dem ACE-Hemmer Ramipril zwar auch zu einer Albuminurie, diese war aber nach 4- und nach 8 Wochen signifikant geringer als in den anderen Behandlungsgruppen der 5/6 Nx- Tiere (Werte nach 8 Wochen: Ramipril: $862,8 \pm 289,2 \mu\text{g}/24\text{h}$, 1471: $16.942,1 \pm 3467,2 \mu\text{g}/24\text{h}$, Fenbendazol: $13543 \pm 1706 \mu\text{g}/24\text{h}$, Placebo: $7953,1 \pm 1833,8 \mu\text{g}/24\text{h}$, $p < 0,05$).

Zusammenfassend können folgende Punkte festgehalten werden, die sich aus den Abschnitten 4.1. bis 4.4. ergeben:

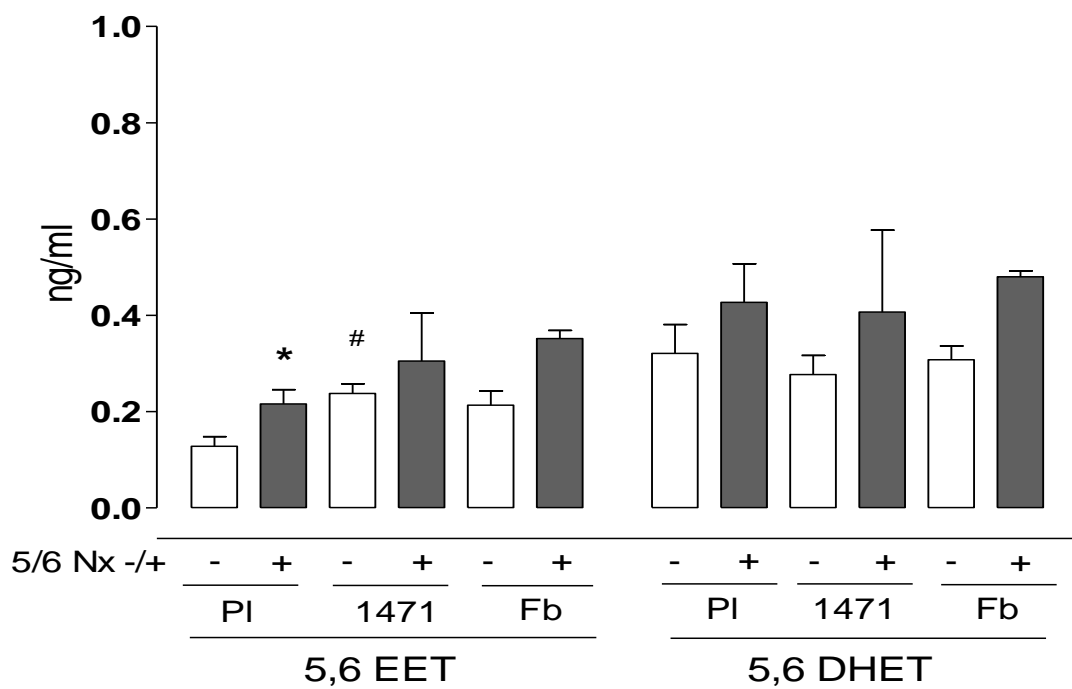
1. Die 5/6 Nx ist eine geeignete Methode, um den Zustand der chronischen Niereninsuffizienz zu induzieren. Das zeigt sich an den dargestellten Parametern (Überlebensrate, Entwicklung des Körpergewichts, des Blutdrucks und der Albuminurie).
2. Die Hemmung der sEH durch 1471 führt nicht zu einer Progressionshemmung der chronischen Niereninsuffizienz, sondern steigert sogar die Albuminurie.
3. Die Gabe des ACE-Hemmers Ramipril hemmt die Progression der chronischen Niereninsuffizienz (verbesserte Überlebensrate, niedrigerer Blutdruck, verminderte Albuminurie).
4. Die Gabe von Fenbendazol hat keinen Effekt auf die Progression der Niereninsuffizienz.

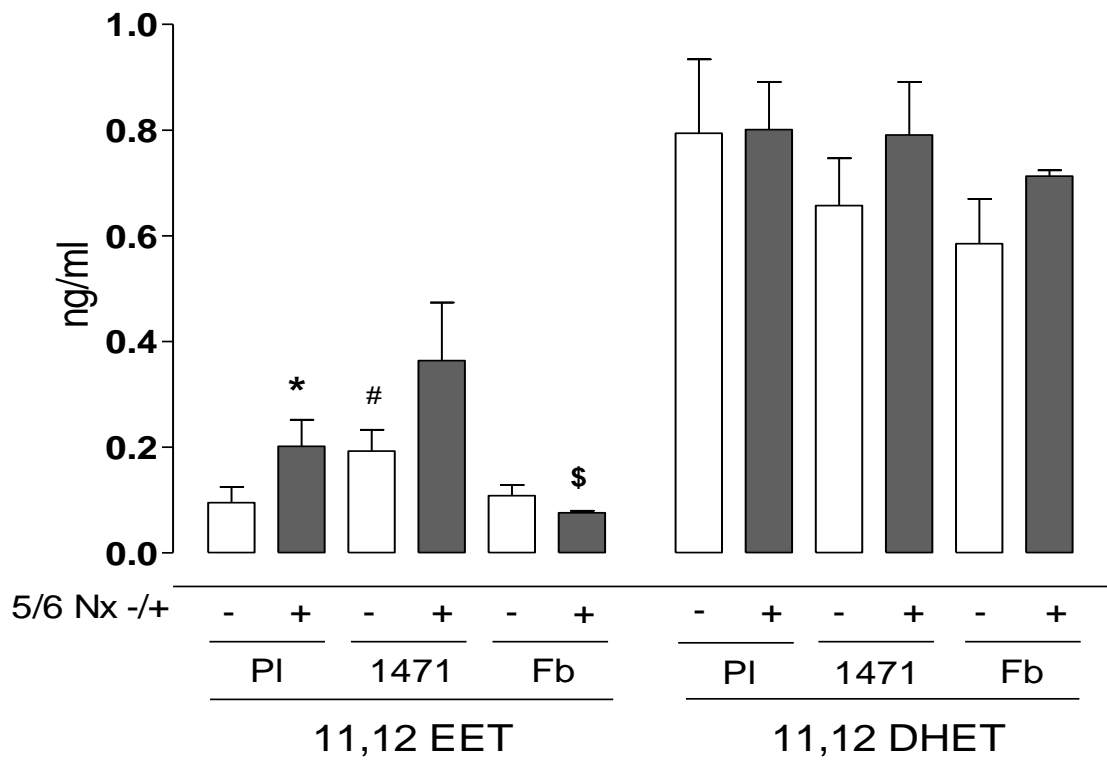
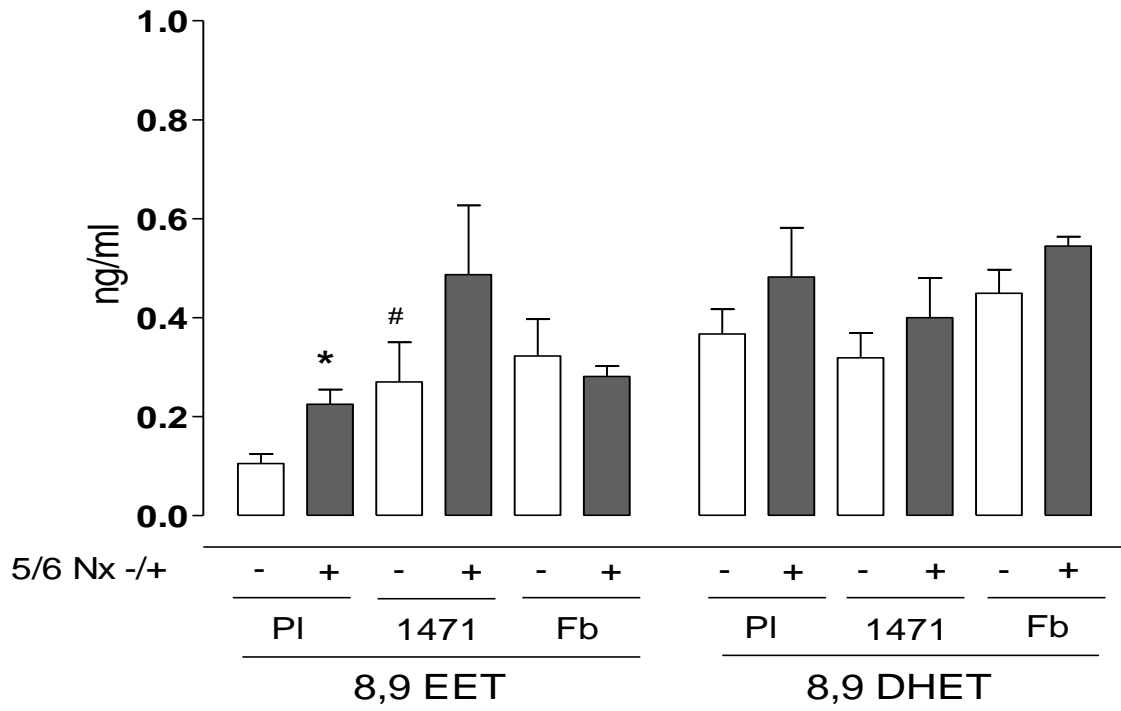
4.5 EET Konzentrationen und Derivate

Im Folgenden wird dargestellt, welchen Effekt die 5/6 Nephrektomie auf die EET-, die DHET- und die HETE Konzentrationen im Plasma hat.

Des Weiteren wird gezeigt, was eine Hemmung des EET-Abbaus durch den sEH-Inhibitor 1471 und eine Hemmung der EET Synthese durch den CYP-Inhibitor Fenbendazol bezüglich der EET-, der DHET- und der HETE Konzentrationen bewirkt.

4.5.1 EET- und DHET Konzentrationen





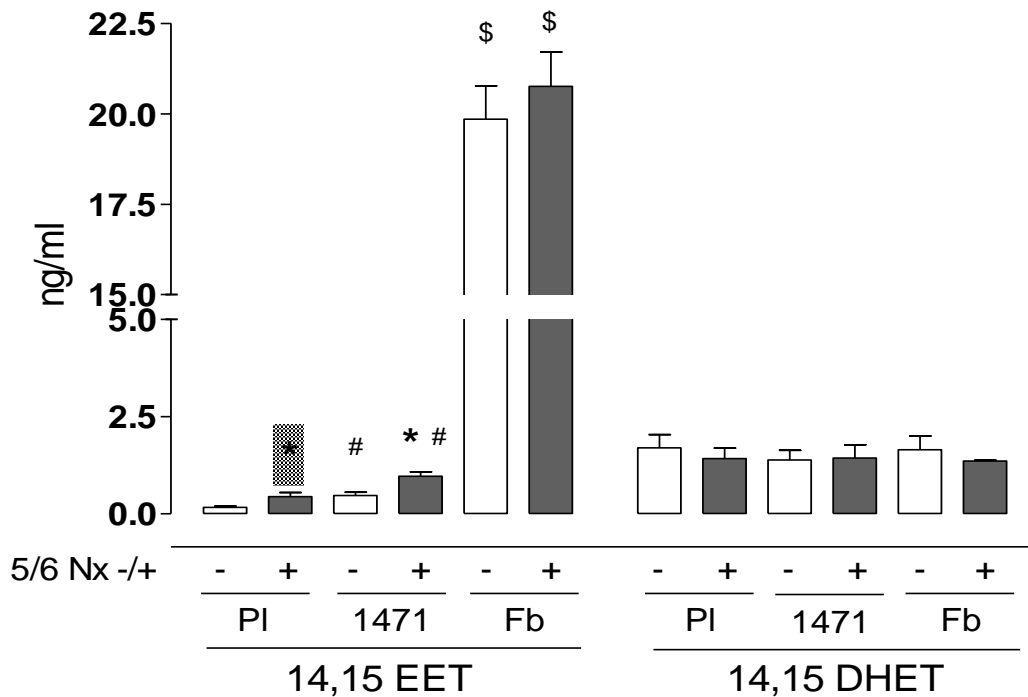


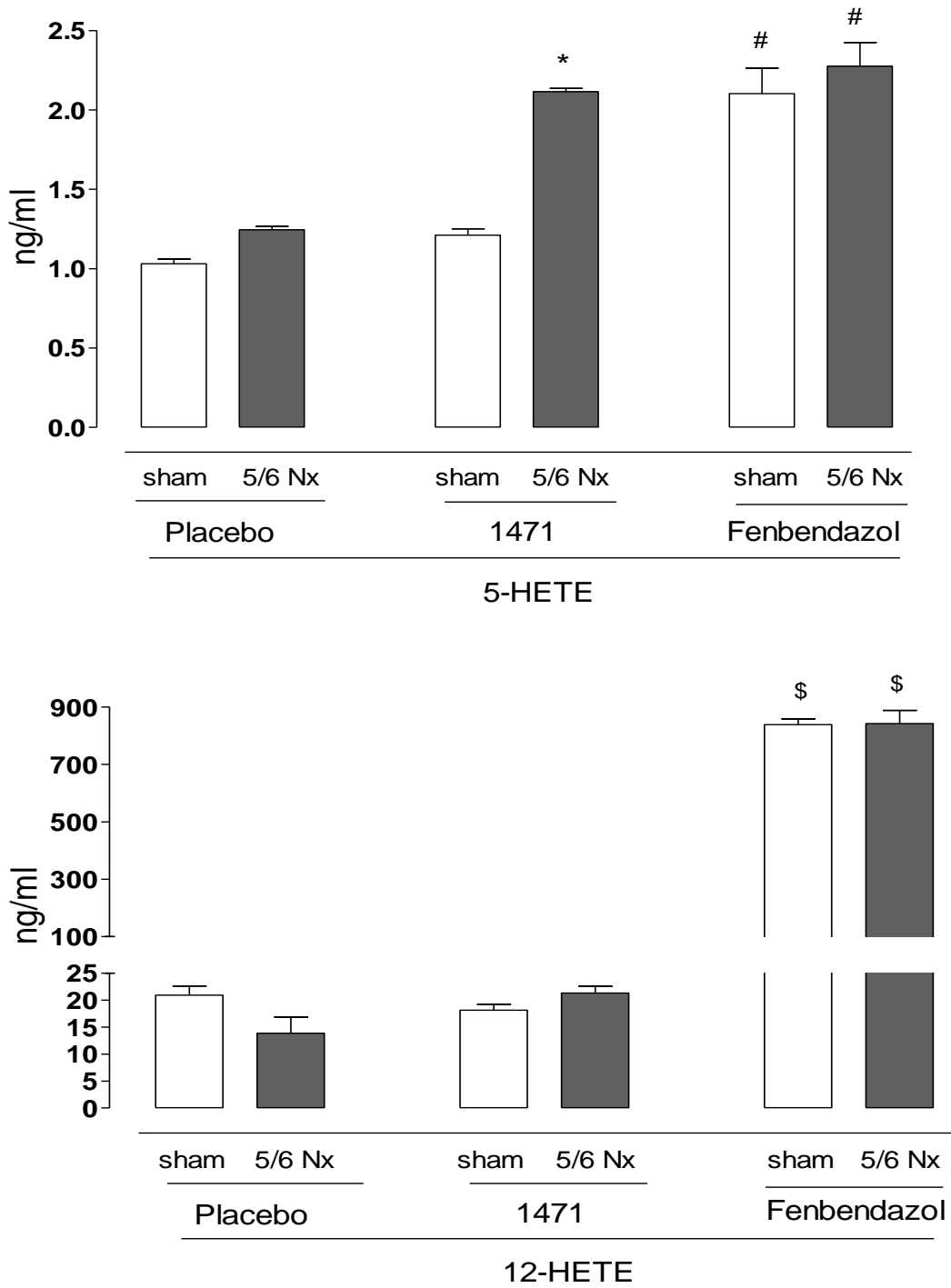
Abb. 17. Darstellung der verschiedenen EET- und DHET Konzentrationen im Plasma bei Versuchende. PI = Placebo, Fb = Fenbendazol. * $p < 0.05$ vs. sham, # $p < 0.05$ vs. Placebo, \$ $p < 0.05$ vs. alle

Die 5/6 Nx-Tiere zeigten in jeder dargestellten EET-Form (5,6 EET, 8,9 EET, 11,12 EET und 14,15 EET) signifikant erhöhte Spiegel verglichen mit der sham Gruppe. Bei den sham-operierten Tieren fand sich bei der mit 1471 behandelten Gruppe eine signifikant höhere Konzentration der verschiedenen EET-Formen als in der Placebo-Gruppe.

Bei den 5/6 Nx-Tieren wiesen die mit Fenbendazol behandelten Tiere eine signifikant niedrigere 11,12 EET Konzentration auf als die Vergleichsgruppen. Die mit Fenbendazol behandelten Tiere zeigten sowohl in der sham als auch in der 5/6 Nx-Gruppe signifikant erhöhte 14/15 EET Konzentrationen verglichen mit allen Vergleichsgruppen. Dieser massiv erhöhte Wert ist ein Hinweis darauf, dass ein Messfehler vorliegt, der möglicherweise durch das Peak-Verteilungsmuster für 14,15 EETs in der LC-MS/MS bedingt ist.

Die verschiedenen DHET Konzentrationen zeigten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen.

4.5.2 HETE Konzentrationen



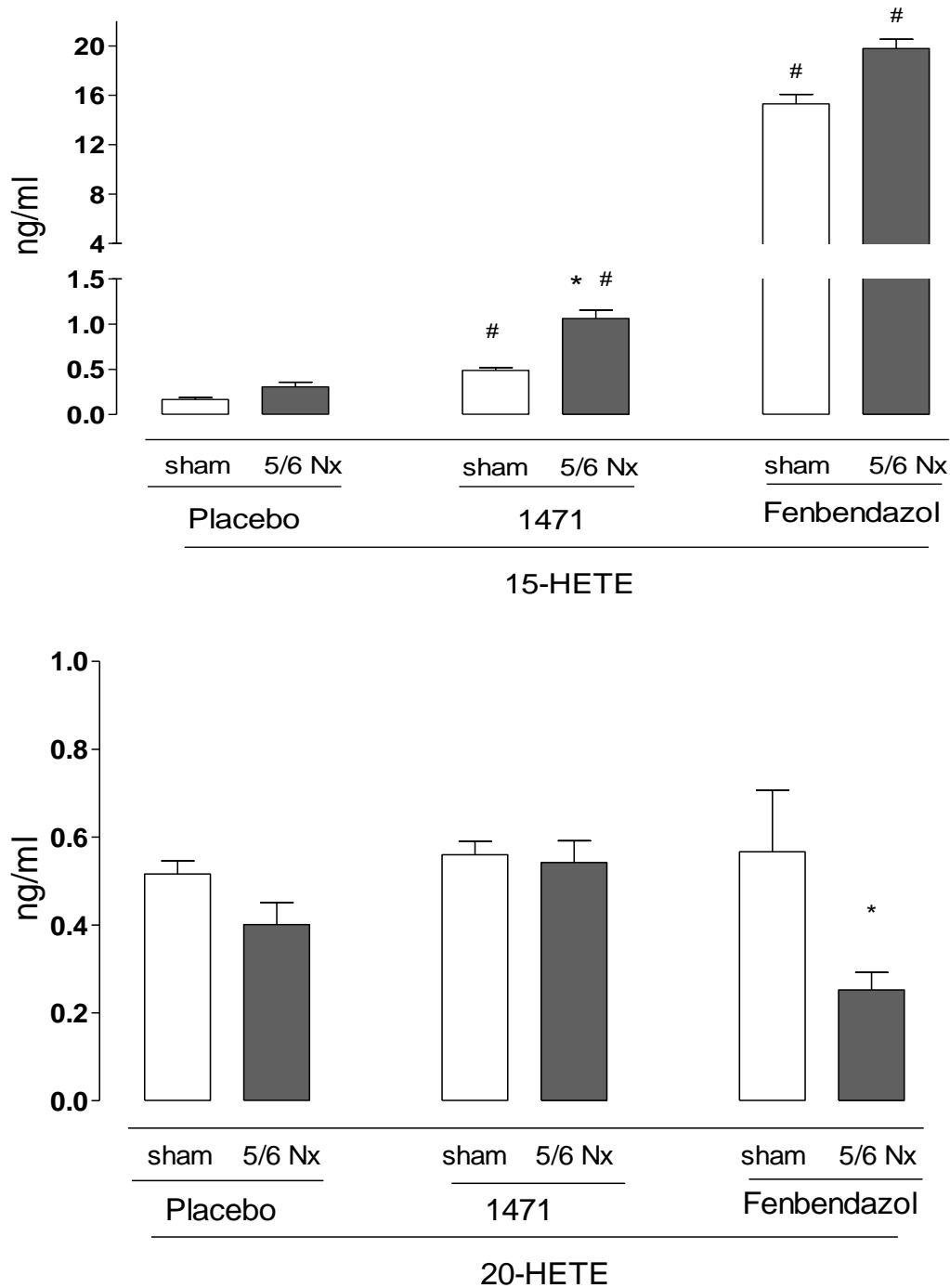


Abb. 18. Darstellung der verschiedenen HETE Konzentrationen im Plasma bei Versuchende. * $p < 0.05$ vs. sham, # $p < 0.05$ vs. Placebo, \$ $p < 0.05$ vs. alle

Die 5/6 Nx-Tiere wiesen keine signifikanten Veränderungen bezüglich der HETE Konzentrationen (5-HETE, 12-HETE, 15-HETE, 20-HETE) im Plasma verglichen mit der sham-Gruppe auf.

Bei den 5/6 Nx-Tieren fand sich in der 1471-Gruppe eine signifikante Erhöhung der 5-HETE- und der 15-HETE Konzentration verglichen mit der sham-Gruppe. Die Gabe von Fenbendazol zeigte sowohl in der 5/6 Nx- als auch in der sham-Gruppe eine signifikante

Erhöhung der 5-HETE-, der 12-HETE- und der 15-HETE Konzentration verglichen mit den jeweiligen Placebo-Gruppen.

Die 20-HETE Konzentration war dagegen in der 5/6 Nx-Gruppe unter Fenbendazol Therapie signifikant erniedrigt gegenüber der 5/6 Nx-Gruppe unter Placebo Therapie.

Zusammenfassend können folgende Punkte festgehalten werden, die sich aus dem Abschnitt 4.5. ergeben:

1. Die 5/6 Nephrektomie führte zu erhöhten EET-Konzentrationen im Plasma.
2. Die Hemmung der sEH mittels 1471 führt bei den sham- und zum Teil auch bei den 5/6 Nx-Tieren zu einem signifikanten Anstieg der EETs verglichen mit den jeweiligen Placebo-Gruppen. Des Weiteren zeigen die 5/6 Nx-Tiere unter 1471 Therapie signifikante Erhöhungen der 5-HETE und der 15-HETE-Konzentrationen.
3. Eine CYP-Inhibition durch Fenbendazol führt sowohl in den sham- als auch in den 5/6 Nx-Gruppen zu einer signifikanten Erhöhung der 5-HETE, 12-HETE und 15-HETE Konzentration verglichen mit den jeweiligen Placebo-Gruppen.

4.6 Renale Enzym Expression

Um zu untersuchen, ob die erhöhten EET-Konzentrationen bei den 5/6-nephrektomierten Tieren Folge einer verminderten Expression der sEH (Funktion: EET Abbau) oder einer erhöhten Expression der CYP-Epoxygenasen (Funktion: EET-Synthese) waren, wurde die Expression dieser Enzyme auf mRNA-Ebene bestimmt. Ob eine verstärkte LOX- oder CYP-Expression bei der Entwicklung der chronischen Niereninsuffizienz bei der Maus eine Rolle spielt, ist ebenfalls im Folgenden dargestellt.

4.6.1 sEH Expression in der Niere

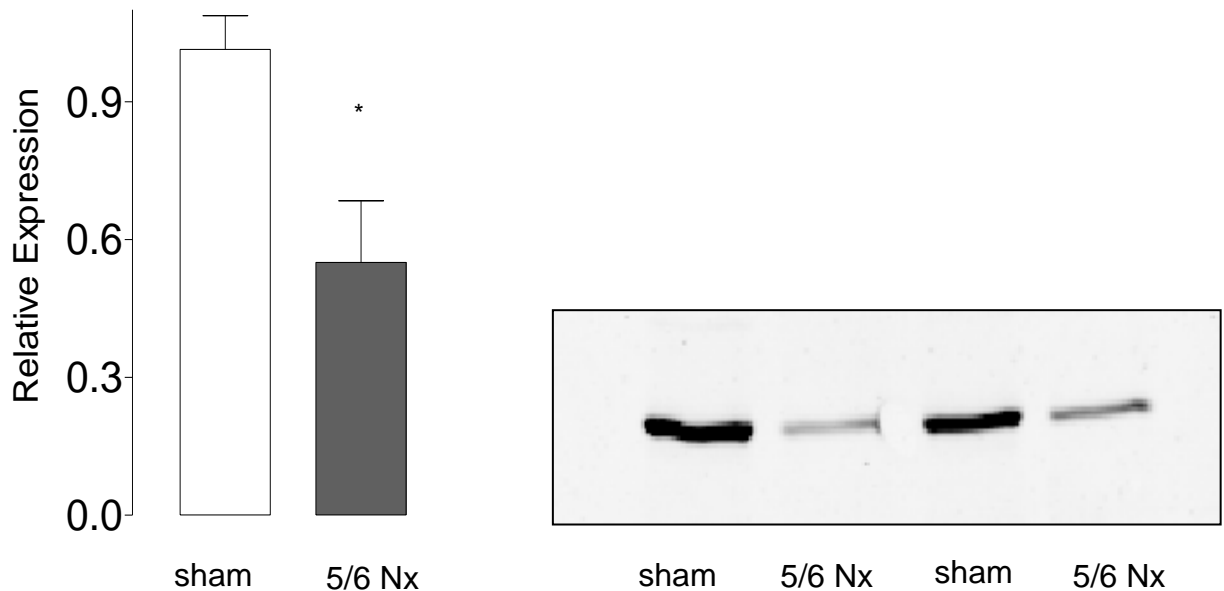


Abb. 19. Relative sEH Expression bei sham-operierten und 5/6 Nx-Tieren auf mRNA Ebene (links) und im Western Blot (rechts) dargestellt. * <math>p < 0,05</math> vs. sham

Die 5/6 Nx Tiere zeigten eine signifikant niedrigere relative sEH Expression auf mRNA Ebene verglichen mit den sham operierten Tieren ($1,1 \pm 0,05$ vs. $0,55 \pm 0,15$, $p < 0,05$).

4.6.2 5-Lox-, 12-Lox- und 15-Lox Expression in der Niere

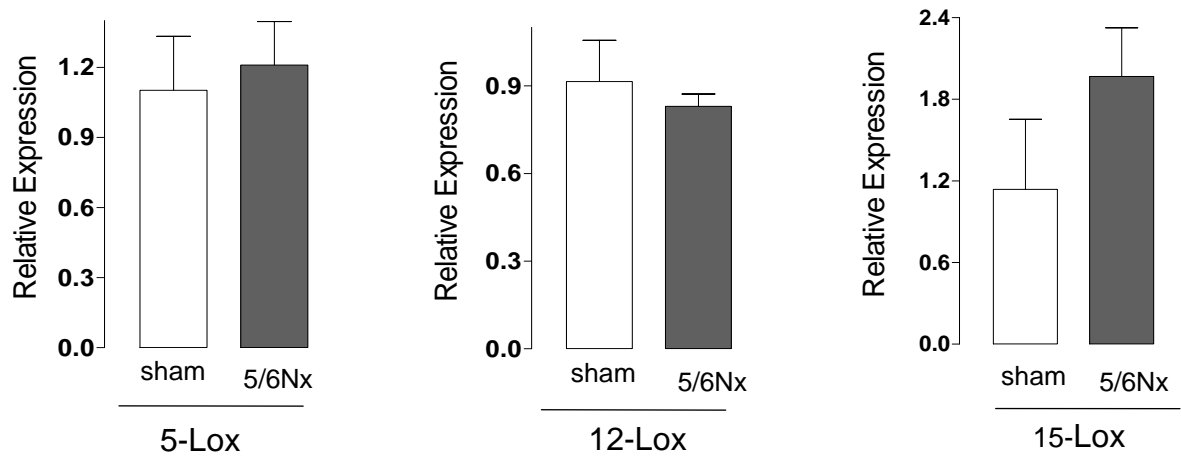


Abb. 20. Relative Expression der 5-Lox-, 12-Lox- und 15-Lox mRNA in der Niere bei sham- und 5/6 Nx-Tieren

Die Expression der Lipoxygenasen zeigt keine signifikanten Unterschiede zwischen den verschiedenen Gruppen.

4.6.3 Phospholipase A₂-, CYP2C40- und CYP2C38 Expressionen in der Niere

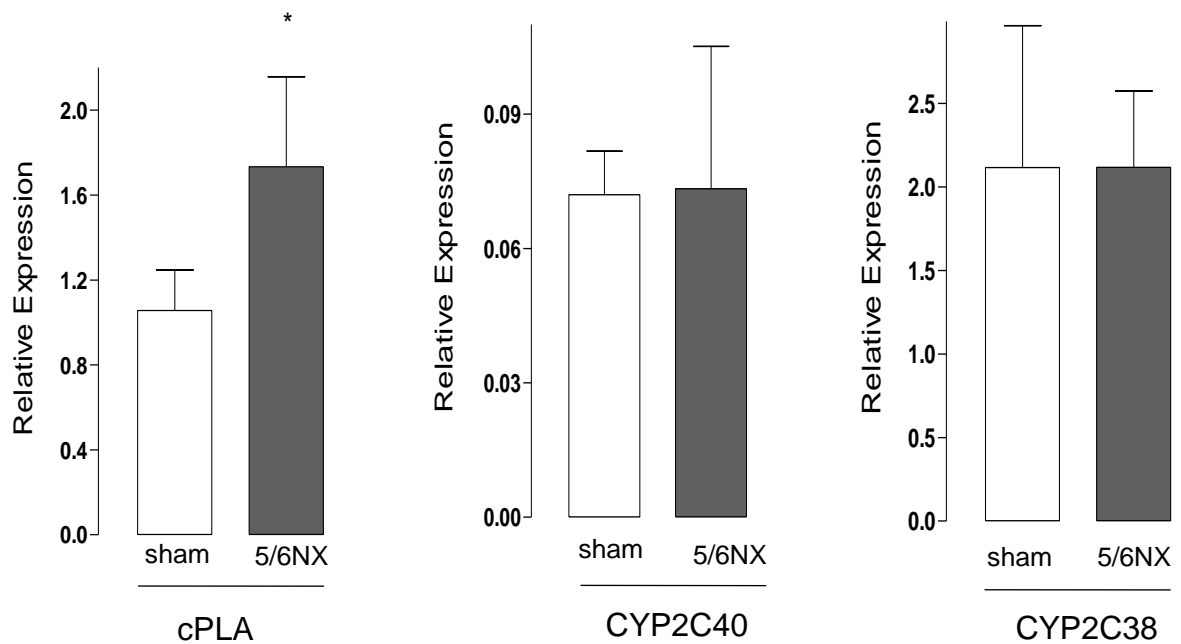


Abb. 21. Relative Expression der cytosolischen Phospholipase A₂-Cyp2C40 und Cyp2C38 mRNA in der Niere bei sham- und 5/6 Nx-Tieren.

Die 5/6 Nx führt zu einer signifikanten Steigerung der relativen Expression der mRNA der cytosolischen Phospholipase A₂ ($1,89 \pm 0,4$ vs. $1,05 \pm 0,15$, $p < 0,05$).

Die relative Expression der mRNA von CYP2C40 und CYP2C38 unterschied sich nicht signifikant zwischen den sham- und den 5/6 Nx-Gruppen.

4.7 1471-Plasmaspiegel

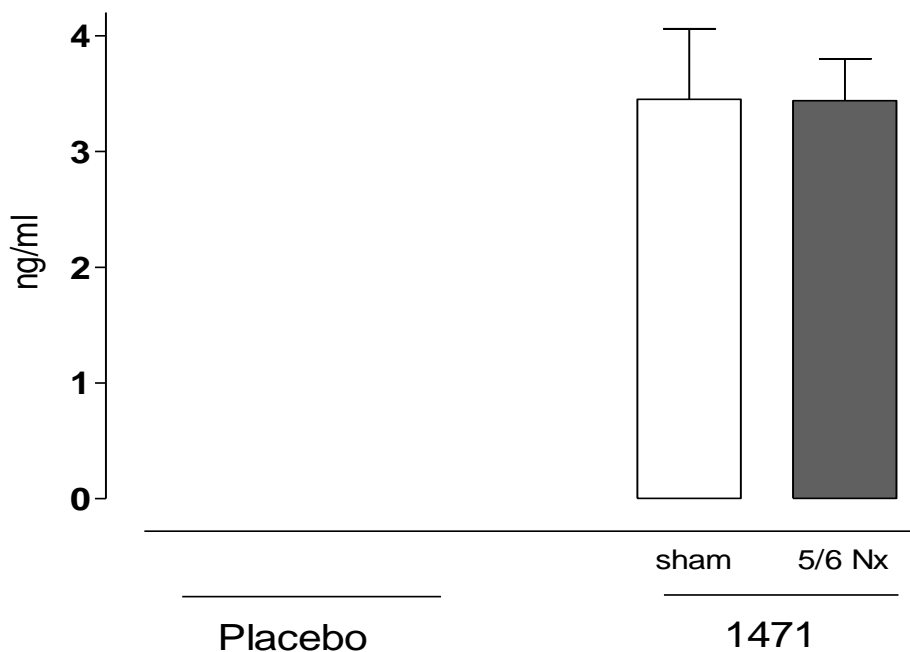


Abb. 22. 1471 Plasmaspiegel, gemessen nach Versuchsende

Die Graphik zeigt, dass sich bei den mit 1471 behandelten Tieren die Substanz im Plasma nachweisen ließ, im Gegensatz zu den Placebo Tieren.

Zusammenfassend können folgende Punkte festgehalten werden, die sich aus dem Abschnitt 4.6 und 4.7 ergeben:

1. Die 5/6 Nephrektomie führt zu einer signifikanten Verminderung der relativen Expression der sEH in der verbleibenden Niere verglichen mit der sham-Gruppe.
2. Die erhöhten EET-Spiegel in den 5/6 Nx-Tieren lassen sich nicht durch eine gesteigerte Expression der CYP Enzyme erklären.
3. Die Aufnahme des sEH-Inhibitors 1471 konnte in der mit dieser Substanz behandelten Gruppe im Plasma nachgewiesen werden.

4.8 Nierenhistologie

4.8.1 Glomerulosklerose

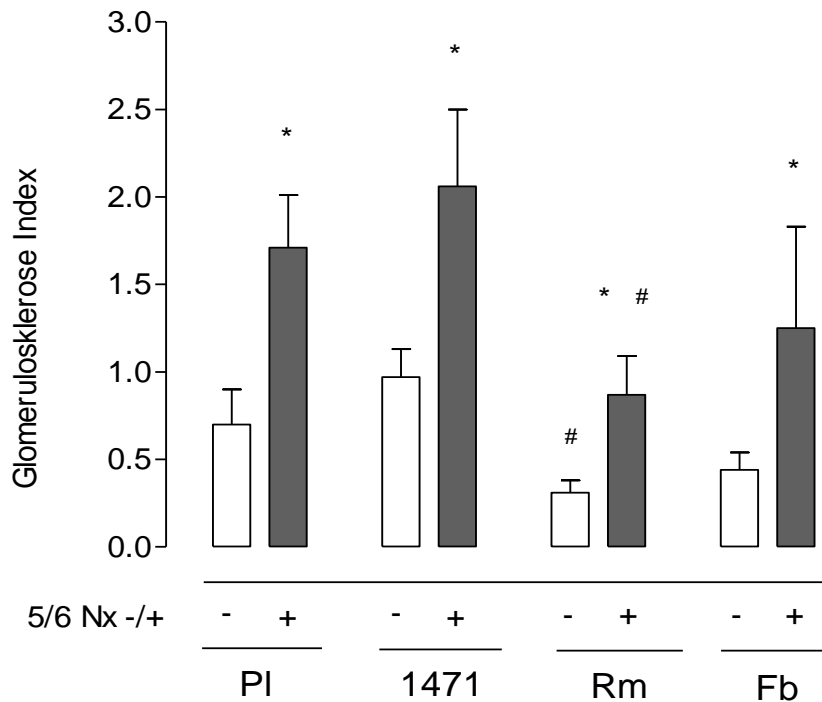


Abb. 23. Histologisch ausgewerteter Glomerulosklerose Index der Nieren der verschiedenen Behandlungsgruppen. PI = Placebo, Rm = Ramipril, Fb = Fenbendazol * $p < 0,05$ vs. sham, # $p < 0,05$ vs. PI, 1471 und Fb.

Die 5/6 Nephrektomie führte in dem verbleibenden Nierenanteil zu einer signifikanten Glomerulosklerose im Vergleich zu den sham-Tieren (5/6 Nx: $1,71 \pm 0,3$ vs. sham: $0,7 \pm 0,2$, $p < 0,05$). Bei den sham-operierten Tieren zeigte sich in den Nieren der mit Ramipril behandelten Gruppe eine signifikant niedrigere Glomerulosklerose als in den zu vergleichenden sham-Gruppen (Ramipril: $0,31 \pm 0,07$ vs. Placebo: $0,7 \pm 0,2$, 1471: $0,97 \pm 0,16$, Fenbendazol: $0,44 \pm 0,1$ $p < 0,05$).

Die 5/6 Nx-Tiere entwickelten dagegen unabhängig von der Therapie eine im Vergleich zur jeweiligen sham-Gruppe signifikante Glomerulosklerose (1471: $2,06 \pm 0,44$ vs. $0,97 \pm 0,16$, Ramipril: $0,87 \pm 0,22$ vs. $0,31 \pm 0,07$, Fenbendazol: $1,25 \pm 0,58$ vs. $0,44 \pm 0,1$, $p < 0,05$).

Bemerkenswert war, dass die 5/6 Nx-Tiere unter Ramipril einen signifikant niedrigere Glomerulosklerose entwickelten als die 5/6 Nx-Tiere unter Placebo, 1471 und Fenbendazol Therapie (Ramipril: $0,87 \pm 0,22$ vs. Placebo: $1,71 \pm 0,3$, 1471: $2,06 \pm 0,44$, Fenbendazol:

1,25 ± 0,58 g, $p < 0,05$). Die Gabe von 1471 oder Fenbendazol führte bei den 5/6 Nx-Tieren zu keinen signifikanten Veränderungen im Vergleich zur Placebo-Gruppe.

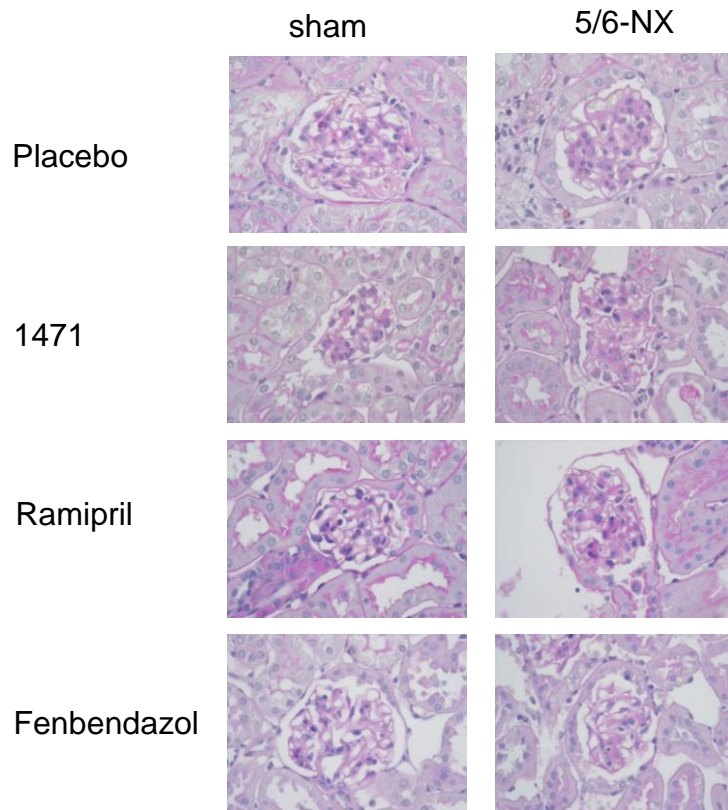


Abb. 24. Histologische Bilder der Glomeruli der verschiedenen Behandlungsgruppen nach Versuchsende. Färbung: PAS (Perjod acid Schiff). Vergrößerung: 1:400.

4.8.2 Tubulointerstitieller Schaden

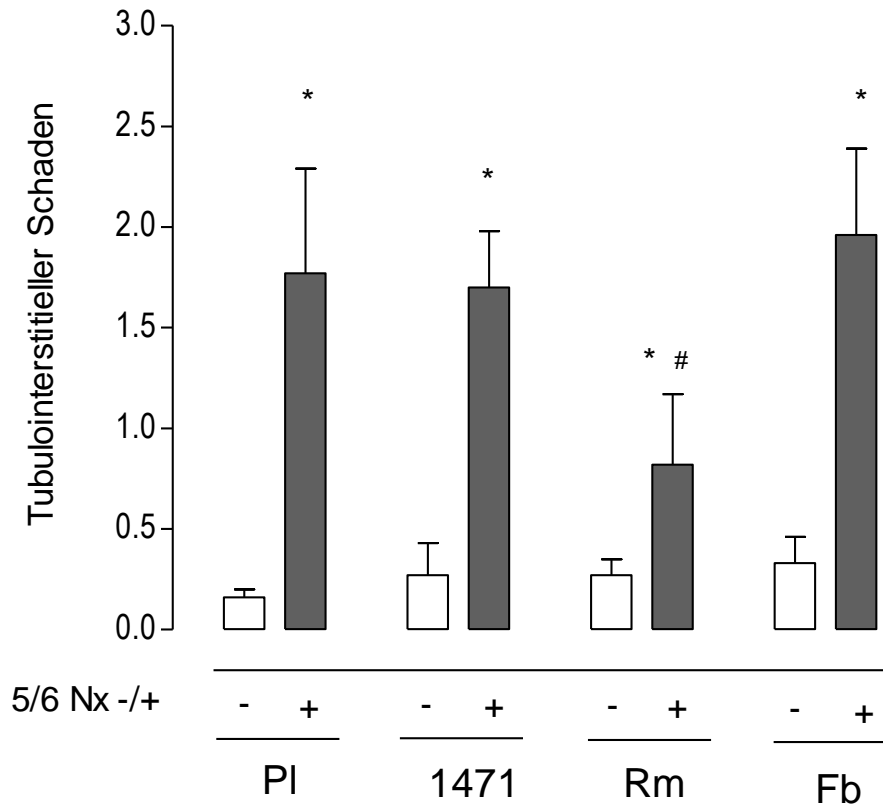


Abb.25. Histologisch ausgewerteter tubulointerstitieller Schaden der Nieren verschiedenen Behandlungsgruppen nach Versuchende. PI = Placebo, Rm = Ramipril, Fb = Fenbendazol * $p < 0,05$ vs. sham, # $p < 0,05$ vs. PI, 1471 und Fb.

Die 5/6 Nephrektomie führte in dem verbleibenden Nierenanteil zu einem signifikanten tubulointerstitiellen Schaden im Vergleich zu den sham-Tieren (5/6 Nx: $1,77 \pm 0,52$ vs. sham: $0,16 \pm 0,04$, $p < 0,05$). Bei den sham-operierten Tieren zeigten sich keine signifikanten Veränderungen zwischen den verschiedenen Behandlungsgruppen.

Die 5/6 Nx-Tiere entwickelten dagegen unabhängig von der Therapie einen im Vergleich zur jeweiligen sham-Gruppe signifikanten tubulointerstitiellen Schaden (1471: $1,7 \pm 0,28$ vs. $0,27 \pm 0,16$, Ramipril: $0,82 \pm 0,35$ vs. $0,27 \pm 0,08$, Fenbendazol: $1,96 \pm 0,43$ vs. $0,33 \pm 0,13$, $p < 0,05$). Analog zur Glomerulosklerose entwickelten die 5/6 Nx-Tiere unter Ramipril einen signifikant niedrigeren tubulointerstitiellen Schaden als die 5/6 Nx-Tiere unter Placebo, 1471 und Fenbendazol Therapie (Ramipril: $0,82 \pm 0,35$ vs. Placebo: $1,77 \pm 0,52$, 1471: $1,7 \pm 0,28$, Fenbendazol: $1,96 \pm 0,43$, $p < 0,05$). Die Gabe von 1471 oder Fenbendazol führte bei den 5/6 Nx-Tieren zu keinen signifikanten Veränderungen im Vergleich zur Placebo Gruppe.

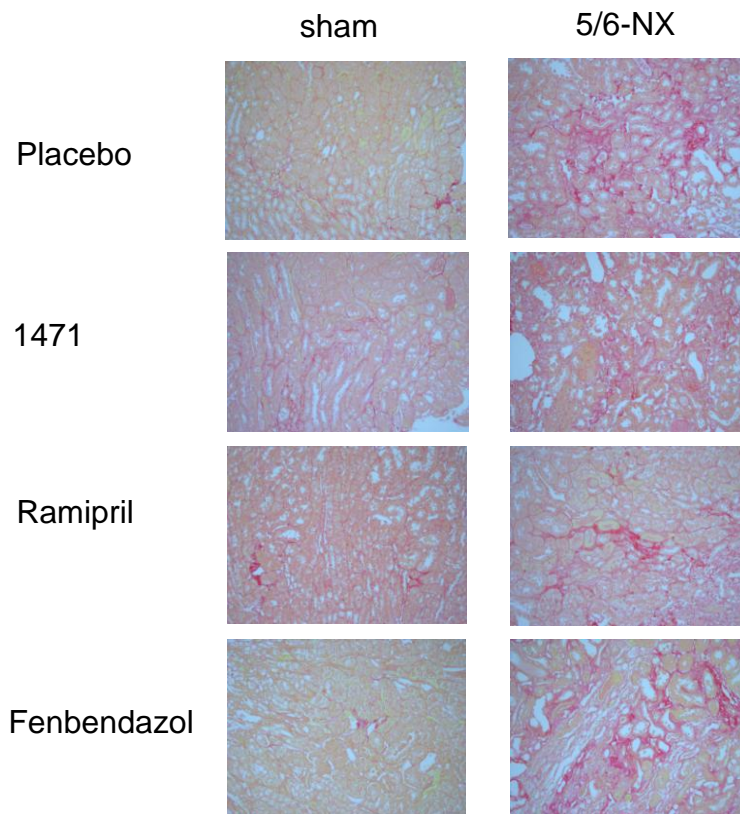


Abb. 26. Histologische Bilder des tubulointerstitiellen Schadens der verschiedenen Behandlungsgruppen nach Versuchsende. Färbung: Sirius Rot. Vergrößerung: 1:100

Hier nicht aufgeführt sind die Daten zur Entwicklung der Fibrose und des vaskulären Schadens. Die zu diesen Parametern erhobenen Ergebnisse stimmen von der Tendenz her mit den Werten der Glomerulosklerose und des tubulointerstitiellen Schadens überein. Aus Gründen der Übersichtlichkeit wird hier auf die Darstellung verzichtet.

Zusammenfassend können folgende Punkte festgehalten werden, die sich aus dem Abschnitt 4.8 ergeben:

1. Analog zu dem Anstieg des arteriellen Blutdrucks und der Proteinurie führte die 5/6 Nephrektomie zu einer signifikanten histologischen Schädigung.
2. Die sEH-Hemmung durch 1471 und die Cytochrom P450-Hemmung mittels Fenbendazol zeigten keinen signifikanten Unterschied bezüglich des histologischen Schadens verglichen mit der Placebo-Gruppe.
3. Die ACE-Hemmung durch Ramipril führte zu einer signifikanten Reduktion des histologischen Schadens verglichen mit der Placebo-Gruppe.

5 Diskussion

In der vorliegenden Promotionsarbeit wurde die Fragestellung untersucht, ob eine chronische sEH-Inhibition mit dem speziellen Hemmstoff 1471 die Progression der chronischen Niereninsuffizienz bei der Maus hemmt.

Um den Status der chronischen Niereninsuffizienz zu induzieren, wurden die Tiere einer 5/6 Nephrektomie unterzogen. Hierunter entwickelten sie einen signifikanten Anstieg des arteriellen Blutdrucks, der Proteinurie und der histologischen Schädigung (gemessen am Ausmaß der Glomerulosklerose, der tubulointerstitiellen Schädigung und der Fibrose).

Wie zu erwarten, führte die chronische ACE-Hemmung durch Ramipril bei den 5/6 Nx-Tieren zu einer signifikanten Reduktion der Blutdruckwerte, der Albuminurie und des histologischen Schadens verglichen mit den Placebo behandelten 5/6 Nx-Tieren. Die antihypertensiven Eigenschaften der ACE-Hemmer am Menschen sind lange bekannt (Gavras et al., 1974). Eine Hemmung der Albuminurie und des glomerulären Schadens in einem Nierenablationsmodell bei der Ratte ebenfalls (Anderson et al., 1986). Die nephroprotektiven Eigenschaften der ACE-Hemmer bei Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz wurden 1999 nachgewiesen (Ruggenti et al., 1999). Diese bekannten Effekte des ACE-Hemmers ließen sich in unserem Modell der chronischen Niereninsuffizienz bei der Maus reproduzieren. Das zeigt, dass sich das Modell der 5/6 Nx gut eignet, um Untersuchungen zur chronischen Niereninsuffizienz durchzuführen und dass der durchgeführte Eingriff nicht zu aggressiv ist.

5.1 Die Rolle der sEH im Modell der chronischen Niereninsuffizienz bei der Maus

Die Hemmung der sEH durch 1471 führte bei den 5/6 Nx-Tieren zu keiner Reduktion des Blutdrucks und zu keiner Progressionshemmung der Nierenschädigung. Im Gegenteil, diese Gruppe wies nach 8 Wochen sogar eine höhere Albuminurie verglichen mit der Placebo-behandelten 5/6 Nx-Gruppe auf. Eine mangelnde sEH-Inhibition aufgrund einer fehlenden Aufnahme von 1471 konnte durch den Direkt-Nachweis im Plasma ausgeschlossen werden (siehe Abb. 22). Hieraus lässt sich schlussfolgern, dass die vielfach beschriebenen vasodilatativen, antiinflammatorischen, antiproliferativen Effekte der EETs bzw. der sEH-Inhibition (Fisslthaler et al., 1999, Node et al., 1999, Campbell, 2000,

Fleming et al., 2001, Sun et al., 2002, Archer et al., 2003) sich im verwendeten Modell der chronischen Niereninsuffizienz bei der Maus nicht zeigen. Im Gegenteil, die Gabe von 1471 beschleunigte eher die Progression, was sich in der massiven Proteinurie widerspiegelt, die als Parameter für das Vorliegen einer chronischen Nierenerkrankung beim Menschen und beim Tier etabliert ist (Remuzzi und Bertani, T., 1998, Ruggenenti et al., 1998, Ma und Fogo, A. B., 2003). Die Gabe von 1471 führte in dem hier vorliegenden Modell zu keiner Blutdrucksenkung. Dabei ist der antihypertensive Effekt eines oral applizierten sEH-Inhibitors in vielen Bluthochdruckmodellen am Tier gezeigt worden (Imig et al., 2005, Jung et al., 2005, Loch et al., 2007). In diesen Studien handelt es sich jedoch um Angiotensin II vermittelte Bluthochdruckmodelle, bei denen der antihypertensive Effekt der sEH-Inhibition wahrscheinlich über eine gesteigerte Natrium-Exkretion und durch Druckdiurese infolge einer gesteigerten Nierendurchblutung vermittelt wird (Imig et al., 2005, Jung et al., 2005, Loch et al., 2007). Im vorliegenden Modell der chronischen Niereninsuffizienz mit eingeschränkter Ausscheidung von Flüssigkeit und Elektrolyten wie beispielsweise Natrium kann sich dieser blutdrucksenkende Effekt der sEH-Inhibition möglicherweise nicht entfalten. In verschiedenen Studien war neben der antihypertensiven auch die daraus resultierende nephroprotektive Wirkung von sEH-Inhibitoren bei der Angiotensin II vermittelten Hypertonie im Rattenmodell gezeigt worden (Zhao et al., 2004, Imig et al., 2005). Da es im vorliegenden Modell der 5/6 Nx unter 1471-Therapie jedoch zu einer arteriellen Hypertonie und einer Proteinurie gekommen ist, konnte hier keine nephroprotektive Wirkung in Form eines reduzierten histologischen Schadens durch die Blutdrucksenkung erwartet werden.

Kürzlich zeigte eine Studie, dass eine Hemmung der sEH allerdings auch unabhängig vom Blutdruck nephroprotektive Eigenschaften hat (Olearczyk et al., 2009). Dabei konnte der sEH-Inhibitor AUDA zwar nicht den Blutdruck im Angiotensin II Bluthochdruck Modell bei der Ratte senken. Es zeigte sich jedoch, dass die mit AUDA behandelten Tiere eine verminderte Proteinurie und einen geringeren glomerulären und tubulointerstitiellen Schaden aufwiesen. Es ist jedoch bekannt, dass Angiotensin II eine direkte inflammatorische Wirkung über die Aktivierung von Nuklear Faktor κ B hat (Ruiz-Ortega und Egido, J., 1997, Wolf et al., 2002). Möglicherweise hat die Hemmung der sEH in einem Modell der Angiotensin II induzierten arteriellen Hypertonie mit einer damit einhergehenden starken inflammatorischen Reaktion eine bessere protektive Wirkung auf

die Niere als in einem chronischen Modell mit geringerer inflammatorischer Reaktion. Der protektive Effekt des sEH-Inhibitors AUDA auf die Niere konnte 2009 in einem Modell des akuten Nierenversagens bei der Maus gezeigt werden. Nach intraperitonealer Injektion des nephrotoxischen Chemotherapeutikums Cisplatin führte die subkutane Gabe von AUDA zu signifikant erhöhten Harnstoffwerten als Retentionsparameter und einem signifikant reduzierten histologischen Schaden (Parrish et al., 2009). Eine weitere Studie zeigte 2009 den anti-inflammatorischen Effekt der sEH-Inhibition mittels 1471 in einem Modell des durch Lipopolysaccharide (LPS) induzierten septischen Schocks in Kombination mit der Gabe von Aspirin und dem FLAP (5 Lipoxygenase activating protein) Inhibitor MK886 (Liu et al., 2009).

Bei den genannten Studien handelt es sich um ein durch LPS induziertes Modell der akuten Inflammation bzw. um ein durch Cisplatin induziertes Modell des akuten Nierenversagens. Dabei betrug die Versuchsdauer im Cisplatin-Modell maximal 96 Stunden (Parrish et al., 2009) und im LPS-Modell sogar nur 6 Stunden (Liu et al., 2009). Möglicherweise hat die sEH-Inhibition in akuten hochgradig inflammatorischen Modellen eine bessere protektive Wirkung auf die Niere als im vorliegenden chronischen Modell. Des Weiteren konnte 2008 gezeigt werden, dass ein Polymorphismus des sEH Gens EPHX2 bei nierentransplantierten Patienten das Risiko einer Transplantatdysfunktion erhöhte (Lee et al, 2008).

5.2 Eine Hemmung der sEH führt zu EET-Akkumulation und Anstieg der LOX-Produkte

In unseren Untersuchungen hatte sich gezeigt, dass die 5/6 Nx-Tiere signifikant höhere EET-Konzentrationen aufwiesen verglichen mit der sham-Gruppe. Ob eine gesteigerte Synthese von EETs für diese Werte verantwortlich war, wurde anhand der relativen mRNA Expression der cPLA₂, der CYP2C40 und der CYP2C38 bestimmt. Die cPLA₂ katalysiert die Abspaltung der Arachidonsäure von den Phospholipiden der Zellmembran und ist so für deren Freisetzung verantwortlich (Gijon und Leslie, C. C., 1999), während die Cytochrom P450-Epoxygenasen (CYP2C40 und CYP2C38) die EETs aus Arachidonsäure bilden. Dabei zeigte sich, dass die relative cPLA₂ Expression in den 5/6 Nx-Tieren gegenüber den sham-operierten Tieren signifikant erhöht war. Die relative Expression von CYP2C40 und CYP2C38 war dagegen zwischen 5/6 Nx- und sham-operierten Tieren nicht signifikant unterschiedlich. Daraus lässt sich ableiten, dass in den 5/6 Nx-Tieren die Arachidonsäure Freisetzung zwar gesteigert war, der erhöhte EET-Spiegel sich aber nicht

auf eine verstärkte Bildung durch CYP P450-Epoxygenasen zurückführen lässt. In weitergehenden Versuchen wurde anschließend die relative Expression der sEH in der Niere der 5/6 Nx- und der sham-Tiere untersucht. Dabei zeigte sich bei 5/6 Nx-Tieren eine signifikante Reduktion der Expression der sEH in der Niere verglichen mit den sham Tieren (siehe Abb. 19). Diese Beobachtungen lassen darauf schließen, dass es bei der 5/6 Nephrektomie zu einer Herabregulation der sEH-Expression in der Niere kommt. Dieser Effekt zeigte sich ebenfalls in einem LPS-induzierten Modell der akuten Hepatitis, bei dem die durch LPS getriggerte Inflammation zu einer verminderten Expression der sEH auf mRNA Ebene führte. Als Folge kam es ebenfalls zu erhöhten EET-Spiegeln und eine zusätzliche Hemmung der sEH mittels AUDA blieb ohne entzündungshemmenden Effekt. Sogar sEH-Knockout Mäuse entwickelten eine inflammatorische Reaktion mit Infiltration von Neutrophilen in die Leber (Fife et al., 2008).

Diese Herabregulation der sEH-Expression ist möglicherweise eine pathophysiologische Anpassungsreaktion des Organismus auf den zugeführten Schaden und der endogene Versuch, diesen durch verminderte sEH-Expression und daraus resultierender EET-Erhöpfung zu kompensieren. Dies schließt jedoch nicht aus, dass EETs nephroprotektive Eigenschaften im vorliegenden Modell haben. Das würde sich mit den für EETs bereits nachgewiesenen nephroprotektiven Eigenschaften im Bluthochdruckmodell bei Ratten decken (Zhao et al., 2004, Imig et al., 2005). Allerdings führt eine medikamentöse Hemmung der sEH durch 1471 zusätzlich zum endogen erfolgenden Anstieg der EETs zu einer Akkumulation von EETs mit keinem zusätzlichen Benefit.

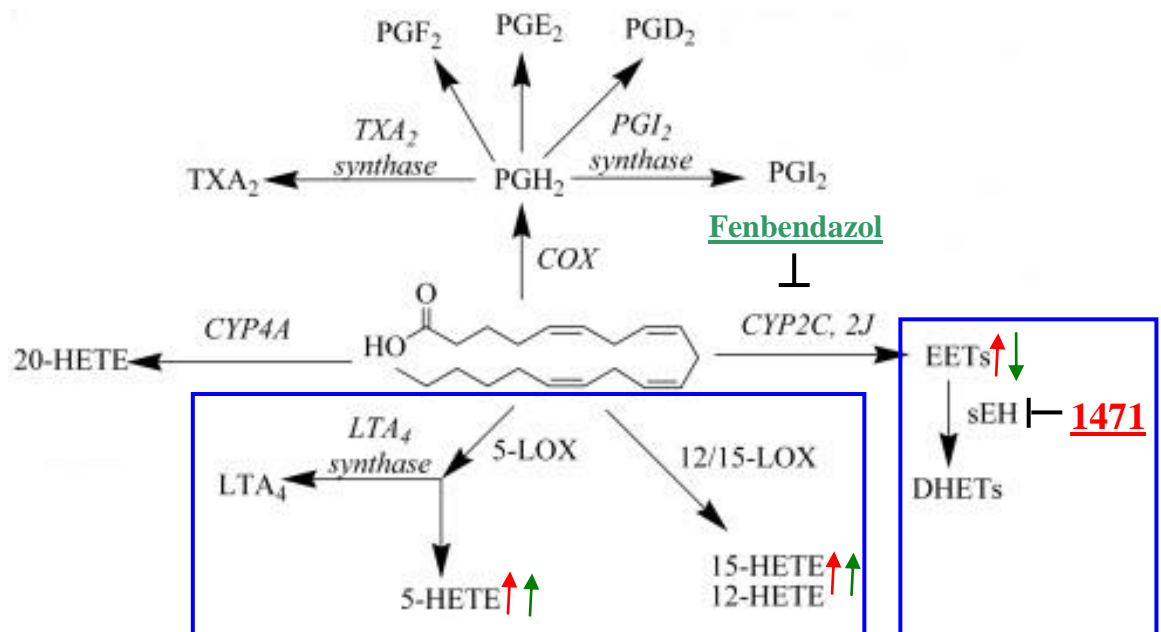


Abb. 27. Überblick über die verschiedenen Arachidonsäure-Stoffwechselwege und Wirkungsweise von Fenbendazol und 1471, modifiziert nach „Inhibition of soluble epoxide hydrolase enhances the anti-inflammatory effects of aspirin and 5-lipoxygenase activation protein inhibitor in a murine model“ von Liu und BD. Hammock

Die mit 1471 behandelten 5/6 Nx-Tiere wiesen signifikant erhöhte 5-HETE und 15-HETE Konzentrationen verglichen mit den Placebo-behandelten 5/6 Nx-Tieren auf. Die verschiedenen HETE-Formen sind Produkte der korrespondierenden 5-, und 15-Lipoxygenase (LOX) (Yamamoto et al., 1997, Brash, 1999)(siehe Abb. 27). Die Lipoxygenase ist (neben der Cyclooxygenase und den Cytochrom P450 Enzymen) eines der Enzyme, welche die Stoffwechselwege des Arachidonsäuremetabolismus katalysieren (siehe Abschnitt 2.3). Die Expression der 5-LO, der 12-LO und der 15-LO zeigte keinen signifikanten Unterschied zwischen den 5/6 Nx-Tieren und den sham-operierten Tieren (siehe Abb. 20). Eine verstärkte Expression dieser Enzyme war demzufolge nicht für die höhere Konzentration der LOX Produkte verantwortlich. Diese Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass es durch die sEH-Inhibition zu einem Rückstau von EETs und möglicherweise zu einem Shift im Stoffwechsel der Arachidonsäure mit gesteigerter Produktion der LOX Produkte gekommen ist (siehe Abb. 27). Als Beispiel eines solchen Mechanismus' in Form eines Shifts im Arachidonsäurestoffwechsel ist seit 1975 das Analgetika-Asthma bekannt (Szczeklik et al., 1975). Dabei kommt es pathogenetisch durch eine Hemmung der COX I und COX II mittels Aspirin zu erhöhten Spiegeln des LOX-Produkts Cys-Leukotrien im Urin (Nasser et al., 1995) und in der ausgeatmeten Luft (Antczak et al., 2002). Es konnte gezeigt werden, dass der erhöhte Spiegel der Cys-Leukotriene im Bronchialsystem konstriktorisch wirkt (Manning et al., 1990).

Für die verschiedenen LOX-Produkte ist eine Vielzahl an Wirkungen bekannt, die zu Schäden des respiratorischen und des kardiovaskulären Systems führen. So wiesen unterschiedliche Studien den proatherosklerotischen Effekt der 12/15 LO nach (Cyrus et al., 1999, Funk und Cyrus, T., 2001). Bei dieser Wirkung spielt die gesteigerte Adhäsion von Monozyten an Gefäßendothel eine Rolle (Hatley et al., 2003). Der Stoffwechselweg der 5-LOX mit 5-HETE als Zwischenprodukt in der Leukotriensynthese (LT) oder als eigenständiges Endprodukt hat in den letzten Jahren in der Erforschung der Atherosklerose und des Asthma bronchiale zunehmend an Bedeutung gewonnen. Ein wichtiges Protein bei der Entstehung von LTs aus Arachidonsäure ist das 5-LOX activating protein (FLAP), welches über einen bisher unbekanntem Mechanismus die 5-LOX aktiviert (Radmark und Samuelsson, B., 2005). Eine Hemmung von FLAP führte in klinischen Studien zu einer verminderten Bildung von bronchokonstriktiven Leukotrienen (LTC₄, LTD₄) und zeigte sich effektiv in der Behandlung von Asthma bronchiale und allergischen Reaktionen (Young, 1991, Diamant et al., 1995). Das kardiovaskuläre System betreffend konnte gezeigt werden, dass 5-LOX bei Patienten mit fortgeschrittener Atherosklerose vermehrt in der Gefäßwand exprimiert wird (Spanbroek et al., 2003). Zusätzlich wurde für Leukotriene nachgewiesen, dass sie an den Koronararterien zu Kontraktionen führen (Michelassi et al., 1982, Allen et al., 1998). Schon lange ist der Einfluss der LT auf Blutdruckregulation und Leukozytenmigration in den perivaskulären Raum eine bekannt (Dahlen et al., 1981). Des Weiteren ist der Zusammenhang zwischen 5-LOX und Nierenschädigung vielfach gezeigt worden. 1993 wurde festgestellt, dass Leukotrien D₄ ein wichtiger Mediator bei der passiven Heymann Nephritis bei der Ratte ist. Dabei führte die Verabreichung des FLAP-Inhibitors MK886 in den erkrankten Tieren zu einer Reduktion der Proteinurie, die im Rahmen der vorher induzierten Nephritis aufgetreten war (Katoh et al., 1993). Bei diabetischen Ratten zeigte sich infolge einer Hemmung von FLAP ebenfalls eine Reduktion der Proteinurie (Valdivielso et al., 2003).

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass möglicherweise die EET Akkumulation als Folge einer medikamentösen Hemmung des Abbaus durch 1471, zusätzlich zum endogen erfolgten Anstieg der EETs, für die fehlende Wirkung der sEH-Hemmung im vorliegenden Modell verantwortlich ist. Ein weiterer Erklärungsansatz ist die gezeigte Erhöhung der LOX-Produkte als Folge eines Shifts im Arachidonsäurestoffwechsel mit den für LOX genannten kardiovaskulären und nierenschädigenden Eigenschaften.

5.3 Eine CYP-Inhibition durch Fenbendazol hat keinen Einfluss auf die Progression der Niereninsuffizienz bei der Maus

Um zu klären, inwiefern EETs profitabel im Modell der chronischen Niereninsuffizienz bei der Maus sind, wurde eine Gruppe der 5/6 Nx-Tiere mit dem Antihelmetikum Fenbendazol, welches CYP-inhibitorische Eigenschaften hat, behandelt. Fenbendazol hemmt die durch CYP Epoxygenasen vermittelte Bildung von 11,12 EETs und 14,15 EETs, während es die Synthese von 5,6 EETs und 8,9 EETs nicht beeinflusst (Keseru et al., 2008). Auf diese Weise sollte untersucht werden, inwiefern eine verminderte 11,12 EET- und 14,15 EET-Konzentration überhaupt eine nephroprotektive Wirkung hat.

Tatsächlich kam es bei den Fenbendazol behandelten Tieren zu einem EET-Abfall, der sich besonders in der gemessenen 11,12 EET Konzentration zeigte. Hier wiesen die mit Fenbendazol behandelten Gruppen (sham und 5/6 Nx) signifikant niedrigere Werte als die Placebo behandelten Gruppen auf. Die 20-HETE Konzentration war in den 5/6-Nx Tieren unter Fenbendazol Therapie signifikant erniedrigt gegenüber den sham operierten Tieren unter Fenbendazol Therapie. 20-HETE ist ein Stoffwechselprodukt der Arachidonsäure und wird durch die CYP-abhängige Hydroxylase aus Arachidonsäure gebildet, die in unseren Versuchen durch Fenbendazol gehemmt worden war. Insofern konnte anhand der 20-HETE Konzentration und den erniedrigten EET Konzentrationen gezeigt werden, dass Fenbendazol CYP-inhibitorisch wirkte.

Die verminderte EET-Konzentration ist insofern von Bedeutung, als dass von den verschiedenen EET-Isoformen insbesondere die 11,12 EETs (neben den 14,15 EETs) zur Relaxation von glatten Gefäßmuskelzellen führen (Node et al., 1999, Zeldin, 2001, Roman, 2002a). An der Niere entfalten sie ihre dilatierende Wirkung an der afferenten Arteriole (Zou et al., 1996, Imig et al., 1996, Imig et al., 1999), indem sie Calcium abhängige Kalium Kanäle aktivieren und so die glatten Muskelzellen der Arteriole hyperpolarisieren (Zou et al., 1996). Eine Hyperpolarisation konnte für 11,12 EETs auch an Thrombozyten nachgewiesen werden, welche zu einer verminderten Adhäsion an Endothelzellen führte (Krotz et al., 2004). Während 11,12 EETs an den arteriellen Gefäßen des großen Kreislaufs zu Gefäßdilatation führen, konnte im Hypoxieversuch bei der Maus eine vasokonstriktorische Wirkung nachgewiesen werden (Keseru et al., 2008). So zeigte die Hemmung der sEH im Modell der Monocrotalin induzierten pulmonalen Hypertonie bei

der Ratte eine Verminderung des vaskulären Remodellings in den Pulmonalarterien (Revermann et al., 2009).

Bezüglich des Blutdrucks, des Verlustes an Körpergewichts, der Albuminurie und des morphologischen Schadens zeigten die mit Fenbendazol behandelten, 5/6 Nx-Tiere keine signifikanten Veränderungen gegenüber den 5/6 Nx-Tieren unter Placebo oder 1471 Therapie. Die Hemmung der EET-Synthese führte demnach zu keiner zusätzlichen klinischen Verschlechterung bei den Tieren, wie es eigentlich zu erwarten gewesen wäre. Allerdings war zu beobachten, dass, analog zu dem beschriebenen Anstieg der verschiedenen HETE-Formen unter 1471 Therapie, auch die Gabe von Fenbendazol zu einem Anstieg dieser LOX-Produkte führte. Durch die CYP-Inhibition mit Fenbendazol wird die Metabolisierung der Arachidonsäure zu 11,12 EET und 14,15 EET blockiert und es kommt möglicherweise zum Aufstau von Arachidonsäure. Durch die nachgewiesene Steigerung der Arachidonsäurefreisetzung durch 5/6 Nx (siehe Abb. 21) und den durch Fenbendazol blockierten CYP-abhängigen Metabolisierungsweg wird die Arachidonsäure verstärkt über alternative (LOX- und COX) Stoffwechselwege metabolisiert. Im vorliegenden Versuch spiegelt sich das in einem signifikanten Anstieg der 5-HETE-, 12-HETE- und der 15-HETE Konzentration bei den mit Fenbendazol behandelten Gruppen wider. Daher wird möglicherweise der Effekt der verminderten EET-Konzentration durch den Anstieg der LOX-Produkte überlagert. In weitergehenden Versuchen wäre interessant gewesen, inwiefern die Gabe eines LOX-Inhibitors Einfluss auf die Progression der Niereninsuffizienz bei der Maus hat. Da jedoch bisher noch keine LOX-Inhibitoren auf dem Markt erhältlich sind, ist diese Frage aktuell nicht zu beantworten.

Das sEH-Gen EPHX2 spielt in der Pathogenese einer Vielzahl von Erkrankungen eine bedeutende Rolle. So konnte gezeigt werden, dass bestimmte Polymorphismen des sEH-Gens beim Menschen mit einem erhöhten Risiko für koronare Herzerkrankungen, (Fornage et al., 2004), Hypercholesterinämie (Sato et al., 2004) und Typ II Diabetes (Ohtoshi et al., 2005) einhergehen. Insgesamt machen die vorliegenden Daten die sEH-Inhibitoren zu einem hoffnungsvollen Wirkstoff in der Behandlung von Herz-Kreislauf-Erkrankungen beim Menschen. Die Entwicklung der sEH-Inhibitoren ist inzwischen soweit, dass im Jahr 2009 ein sEH-Inhibitor der ersten Generation in die klinische Phase IIa eingetreten ist und am Menschen zur Behandlung von Diabetes mellitus Typ II getestet wird. Die Ergebnisse bleiben abzuwarten.

Zusammenfassend erscheint es jedoch fraglich, ob eine sEH-Inhibition im Modell der chronischen Niereninsuffizienz sinnvoll ist. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte die 5/6 Nephrektomie als Methode zur Induktion der chronischen Niereninsuffizienz bei der Maus etabliert und der protektive Effekt des ACE-Hemmers reproduziert werden. Dieses Modell gibt Anlass zur Hoffnung, dass die chronische Niereninsuffizienz und Möglichkeiten der Progressionshemmung weiter erforscht werden können.

6 Zusammenfassung

Deutsch:

Hintergrund: Epoxyeicosatriensäuren (Epoxyeicotrienoic acids, EETs) sind antihypertensiv, anti-inflammatorisch, anti-proliferativ und pro-fibrinolytisch wirksam. Die lösliche Epoxid-Hydrolase (soluble epoxid hydrolase, sEH) wandelt EETs in ihre korrespondierenden, weniger aktiven Dirole (DHETEs) um. Das legt die Vermutung nahe, dass eine Steigerung der EET-Spiegel durch sEH-Inhibition eine Strategie zur Verhinderung von Endorganschäden sein kann. Wir untersuchten den Effekt der sEH-Inhibition im Modell der chronischen Niereninsuffizienz bei der Maus.

Methoden: Es wurde eine 5/6 Nephrektomie (5/6 Nx) an männlichen SV129 Mäusen durchgeführt um eine chronisch progressive Niereninsuffizienz zu induzieren. Postoperativ wurden die Tiere in Gruppen randomisiert und mit Placebo (Leitungswasser), einem ACE-Hemmer (Ramipril, 40 mg/kgKG/d), dem sEH-Inhibitor 1471 (15 mg/kgKG/d) und dem CYP-Inhibitor Fenbendazol (15 mg/kgKG/) für 8 Wochen behandelt.

Ergebnisse: Verglichen mit den sham-operierten Mäusen induzierte die 5/6 Nx einen arteriellen Hypertonus, eine Proteinurie, Glomerulosklerose und eine erhöhte Sterblichkeit. Wie erwartet führte die Gabe von Ramipril zu einer Blutdrucksenkung, einer verminderten Albuminurie und einer verbesserten Überlebensrate. Fenbendazol senkte die Plasma-Konzentration von einigen EETs, hatte aber keinen Einfluss auf die Progression der Niereninsuffizienz. Überraschenderweise kam es unter sEH-Inhibitor-Therapie zu keiner Blutdrucksenkung in diesem Modell. Im Gegenteil, die Proteinurie war sogar noch verstärkt bei den 5/6 Nx-Tieren unter 1471-Therapie verglichen mit der Placebo-Gruppe. Die Plasma-EET-Spiegel waren >2 mal höher in den 5/6 Nx-Mäusen als in der korrespondierenden sham-Gruppe. Die renale sEH-Expression war in den 5/6 Nx-Mäusen vermindert, eine medikamentöse sEH-Inhibition steigerte die EET-Spiegel in diesen Tieren noch weiter. Bemerkenswert war, dass, ausschließlich in den 5/6 Nx-Gruppen, eine sEH-Inhibition und eine CYP-Inhibition zu einer gesteigerten Konzentration von 5-Hydroxyeicosatriensäure (5-HETE), 12-HETE und 15-HETE führte, welche Lipid Peroxidations- und Lipoxygenase-Produkte sind.

Fazit: Im Modell der 5/6 Nephrektomie bei der Maus führt die Hemmung der sEH zu keiner Blutdrucksenkung, sondern zu einer Verschlechterung der Proteinurie. Ursächlich

hierfür sind vermutlich die durch die Niereninsuffizienz hervorgerufene Akkumulation von EETs sowie eine Verschiebung des Arachidonsäure-Metabolismus hin zu Lipoxigenase-Produkten mit nierenschädigender Wirkung.

Englisch:

Background: Epoxyeicotrienoic acids (EETs) are antihypertensive, anti-inflammatory, anti-proliferative and pro-fibrinolytic. The soluble epoxide hydrolase (sEH) converts EETs to their corresponding, less active diols (DHETEs). It has been suggested that increasing endogenous EET-levels by inhibition of the sEH may serve as a therapeutic strategy to prevent end-organ damage. We studied the effect of sEH inhibition in the progression of chronic renal failure.

Methods: 5/6-nephrectomy (5/6 Nx) was performed in male SV129 mice to induce progressive renal failure. After 5/6 Nx mice were randomized into groups receiving Placebo, ACE-inhibitor (Ramipril, 40 mg/KgBW/d) the sEH-inhibitor 1471 (15 mg/kgBW/d) or the CYP inhibitor fenbendazole (15 mg/kgBW/d) for 8 weeks.

Results: As compared to sham operated mice, 5/6 Nx induced hypertension, proteinuria, glomerulosclerosis and resulted in increased mortality. As expected, ACE-inhibitor therapy lowered blood pressure, proteinuria and mortality. Fenbendazol lowered the plasma concentration of some EETs but had no impact on disease progression. Surprisingly, sEH-inhibition failed to lower the blood pressure in this model. Moreover, proteinuria was more severe in the group treated with the sEH-inhibitor as compared to placebo-treated mice. Plasma EET-levels were >2 times higher in 5/6 Nx-mice as compared to sham mice receiving placebo. Renal sEH expression was attenuated in 5/6-Nx mice but sEH-inhibition in these animals still further increased the EET-level. Importantly, selectively in the 5/6 Nx-groups, sEH-inhibition and CYP-inhibition increased the concentrations of 5-hydroxyeicosatetraenoic acids (5-HETE), 12-HETE and 15-HETE, which are lipid peroxidation or lipoxygenase products.

Conclusion: sEH-Inhibition failed to exert renoprotective or antihypertensive effects in the remnant kidney model in mice and showed a tendency to aggravate the progression of the disease. The observed effects might be attributed to an excessive accumulation of EETs in chronic renal insufficiency or to a shift in arachidonic acid metabolism towards lipoxygenase-derived metabolites under sEH-inhibition.

7 Literaturverzeichnis

Referenzen

- Adler AI, Stevens RJ, Manley SE, Bilous RW, Cull CA, Holman RR. (2003), Development and progression of nephropathy in type 2 diabetes: the United Kingdom Prospective Diabetes Study (UKPDS 64). *Kidney Int.*, 63: 225-232.
- Allen S, Dashwood M, Morrison K, Yacoub M. (1998), Differential leukotriene constrictor responses in human atherosclerotic coronary arteries. *Circulation*, 97: 2406-2413.
- Anderson S, Meyer TW, Rennke HG, Brenner BM. (1985), Control of glomerular hypertension limits glomerular injury in rats with reduced renal mass. *J.Clin.Invest*, 76: 612-619.
- Anderson S, Rennke HG, Brenner BM. (1986), Therapeutic advantage of converting enzyme inhibitors in arresting progressive renal disease associated with systemic hypertension in the rat. *J.Clin.Invest*, 77: 1993-2000.
- Antczak A, Montuschi P, Kharitonov S, Gorski P, Barnes PJ. (2002), Increased exhaled cysteinyl-leukotrienes and 8-isoprostane in aspirin-induced asthma. *Am J Respir.Crit Care Med.*, 166: 301-306.
- Archer SL, Gragasin FS, Wu X, Wang S, McMurtry S, Kim DH, Platonov M, Koshal A, Hashimoto K, Campbell WB, Falck JR, Michelakis ED. (2003), Endothelium-derived hyperpolarizing factor in human internal mammary artery is 11,12-epoxyeicosatrienoic acid and causes relaxation by activating smooth muscle BK(Ca) channels. *Circulation*, 107: 769-776.
- Brash AR. (1999), Lipoxygenases: occurrence, functions, catalysis, and acquisition of substrate. *J Biol.Chem.*, 274: 23679-23682.
- Brenner BM, Meyer TW, Hostetter TH. (1982), Dietary protein intake and the progressive nature of kidney disease: the role of hemodynamically mediated glomerular injury in the pathogenesis of progressive glomerular sclerosis in aging, renal ablation, and intrinsic renal disease. *N.Engl.J.Med.*, 307: 652-659.
- Brilla CG, Matsubara LS, Weber KT. (1993), Antifibrotic effects of spironolactone in preventing myocardial fibrosis in systemic arterial hypertension. *Am.J.Cardiol.*, 71: 12A-16A.
- Campbell WB. (2000), New role for epoxyeicosatrienoic acids as anti-inflammatory mediators. *Trends Pharmacol.Sci.*, 21: 125-127.
- Campbell WB, Gebremedhin D, Pratt PF, Harder DR. (1996), Identification of epoxyeicosatrienoic acids as endothelium-derived hyperpolarizing factors. *Circ.Res.*, 78: 415-423.

- Capdevila J, Marnett LJ, Chacos N, Prough RA, Estabrook RW. (1982), Cytochrome P-450-dependent oxygenation of arachidonic acid to hydroxyicosatetraenoic acids. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, 79: 767-770.
- Capra V, Thompson MD, Sala A, Cole DE, Folco G, Rovati GE. (2007), Cysteinyl-leukotrienes and their receptors in asthma and other inflammatory diseases: critical update and emerging trends. *Med.Res.Rev.*, 27: 469-527.
- Chacos N, Falck JR, Wixtrom C, Capdevila J. (1982), Novel epoxides formed during the liver cytochrome P-450 oxidation of arachidonic acid. *Biochem.Biophys.Res.Comm.*, 104: 916-922.
- Chobanian AV, Bakris GL, Black HR, Cushman WC, Green LA, Izzo JL, Jr., Jones DW, Materson BJ, Oparil S, Wright JT, Jr., Roccella EJ. (2003), The Seventh Report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure: the JNC 7 report. *JAMA*, 289: 2560-2572.
- Cyrus T, Witztum JL, Rader DJ, Tangirala R, Fazio S, Linton MF, Funk CD. (1999), Disruption of the 12/15-lipoxygenase gene diminishes atherosclerosis in apo E-deficient mice. *J Clin.Invest*, 103: 1597-1604.
- Dahlen SE, Bjork J, Hedqvist P, Arfors KE, Hammarstrom S, Lindgren JA, Samuelsson B. (1981), Leukotrienes promote plasma leakage and leukocyte adhesion in postcapillary venules: in vivo effects with relevance to the acute inflammatory response. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, 78: 3887-3891.
- Diamant Z, Timmers MC, van d, V, Friedman BS, De SM, Depre M, Hilliard D, Bel EH, Sterk PJ. (1995), The effect of MK-0591, a novel 5-lipoxygenase activating protein inhibitor, on leukotriene biosynthesis and allergen-induced airway responses in asthmatic subjects in vivo. *J Allergy Clin.Immunol.*, 95: 42-51.
- Draper AJ, Hammock BD. (1999), Soluble epoxide hydrolase in rat inflammatory cells is indistinguishable from soluble epoxide hydrolase in rat liver. *Toxicol.Sci.*, 50: 30-35.
- Fife KL, Liu Y, Schmelzer KR, Tsai HJ, Kim IH, Morisseau C, Hammock BD, Kroetz DL. (2008), Inhibition of soluble epoxide hydrolase does not protect against endotoxin-mediated hepatic inflammation. *J Pharmacol.Exp.Ther.*, 327: 707-715.
- Fisslthaler B, Popp R, Kiss L, Potente M, Harder DR, Fleming I, Busse R. (1999), Cytochrome P450 2C is an EDHF synthase in coronary arteries. *Nature*, 401: 493-497.
- Fitzgerald GA. (2004), Coxibs and cardiovascular disease. *N.Engl.J.Med.*, 351: 1709-1711.
- Fleming I. (2007a), DiscreET regulators of homeostasis: epoxyeicosatrienoic acids, cytochrome P450 epoxygenases and vascular inflammation. *Trends Pharmacol.Sci.*, 28: 448-452.
- Fleming I. (2007b), Epoxyeicosatrienoic acids, cell signaling and angiogenesis. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.*, 82: 60-67.
- Fleming I. (2008), Vascular cytochrome p450 enzymes: physiology and pathophysiology. *Trends Cardiovasc.Med.*, 18: 20-25.

- Fleming I, Michaelis UR, Bredenkotter D, Fisslthaler B, Dehghani F, Brandes RP, Busse R. (2001), Endothelium-derived hyperpolarizing factor synthase (Cytochrome P450 2C9) is a functionally significant source of reactive oxygen species in coronary arteries. *Circ.Res.*, 88: 44-51.
- Foley RN, Parfrey PS, Sarnak MJ. (1998), Epidemiology of cardiovascular disease in chronic renal disease. *J.Am.Soc.Nephrol.*, 9: S16-S23.
- Fornage M, Boerwinkle E, Doris PA, Jacobs D, Liu K, Wong ND. (2004), Polymorphism of the soluble epoxide hydrolase is associated with coronary artery calcification in African-American subjects: The Coronary Artery Risk Development in Young Adults (CARDIA) study. *Circulation*, 109: 335-339.
- Frei U, Schober-Halstenberg HJ. (1999), Annual Report of the German Renal Registry 1998. QuaSi-Niere Task Group for Quality Assurance in Renal Replacement Therapy. *Nephrol.Dial.Transplant.*, 14: 1085-1090.
- Funk CD, Cyrus T. (2001), 12/15-lipoxygenase, oxidative modification of LDL and atherogenesis. *Trends Cardiovasc.Med.*, 11: 116-124.
- Gavras H, Brunner HR, Laragh JH, Sealey JE, Gavras I, Vukovich RA. (1974), An angiotensin converting-enzyme inhibitor to identify and treat vasoconstrictor and volume factors in hypertensive patients. *N.Engl.J Med.*, 291: 817-821.
- Gijon MA, Leslie CC. (1999), Regulation of arachidonic acid release and cytosolic phospholipase A2 activation. *J Leukoc.Biol.*, 65: 330-336.
- Greene EL, Kren S, Hostetter TH. (1996), Role of aldosterone in the remnant kidney model in the rat. *J.Clin.Invest*, 98: 1063-1068.
- Gross GJ, Gauthier KM, Moore J, Falck JR, Hammock BD, Campbell WB, Nithipatikom K. (2008), Effects of the selective EET antagonist, 14,15-EEZE, on cardioprotection produced by exogenous or endogenous EETs in the canine heart. *Am.J.Physiol Heart Circ.Physiol*, 294: H2838-H2844.
- Grosser T, Fries S, Fitzgerald GA. (2006), Biological basis for the cardiovascular consequences of COX-2 inhibition: therapeutic challenges and opportunities. *J.Clin.Invest*, 116: 4-15.
- Hatley ME, Srinivasan S, Reilly KB, Bolick DT, Hedrick CC. (2003), Increased production of 12/15 lipoxygenase eicosanoids accelerates monocyte/endothelial interactions in diabetic db/db mice. *J Biol.Chem.*, 278: 25369-25375.
- Hunsicker LG, Adler S, Caggiula A, England BK, Greene T, Kusek JW, Rogers NL, Teschan PE. (1997), Predictors of the progression of renal disease in the Modification of Diet in Renal Disease Study. *Kidney Int.*, 51: 1908-1919.
- Imig JD. (2005), Epoxide hydrolase and epoxygenase metabolites as therapeutic targets for renal diseases. *Am.J.Physiol Renal Physiol*, 289: F496-F503.
- Imig JD, Hammock BD. (2009), Soluble epoxide hydrolase as a therapeutic target for cardiovascular diseases. *Nat.Rev.Drug Discov.*, 8: 794-805.

Imig JD, Inscho EW, Deichmann PC, Reddy KM, Falck JR. (1999), Afferent arteriolar vasodilation to the sulfonimide analog of 11, 12-epoxyeicosatrienoic acid involves protein kinase A. *Hypertension*, 33: 408-413.

Imig JD, Navar LG, Roman RJ, Reddy KK, Falck JR. (1996), Actions of epoxygenase metabolites on the preglomerular vasculature. *J Am Soc.Nephrol.*, 7: 2364-2370.

Imig JD, Zhao X, Capdevila JH, Morisseau C, Hammock BD. (2002), Soluble epoxide hydrolase inhibition lowers arterial blood pressure in angiotensin II hypertension. *Hypertension*, 39: 690-694.

Imig JD, Zhao X, Zaharis CZ, Olearczyk JJ, Pollock DM, Newman JW, Kim IH, Watanabe T, Hammock BD. (2005), An orally active epoxide hydrolase inhibitor lowers blood pressure and provides renal protection in salt-sensitive hypertension. *Hypertension*, 46: 975-981.

Ishizuka T, Cheng J, Singh H, Vitto MD, Manthati VL, Falck JR, Laniado-Schwartzman M. (2008), 20-Hydroxyeicosatetraenoic acid stimulates nuclear factor-kappaB activation and the production of inflammatory cytokines in human endothelial cells. *J.Pharmacol.Exp.Ther.*, 324: 103-110.

Jacobson HR. (1991), Chronic renal failure: pathophysiology. *Lancet*, 338: 419-423.

Jafar TH, Stark PC, Schmid CH, Landa M, Maschio G, De Jong PE, de ZD, Shahinfar S, Toto R, Levey AS. (2003), Progression of chronic kidney disease: the role of blood pressure control, proteinuria, and angiotensin-converting enzyme inhibition: a patient-level meta-analysis. *Ann.Intern.Med.*, 139: 244-252.

Johnson RJ, Alpers CE, Yoshimura A, Lombardi D, Pritzl P, Floege J, Schwartz SM. (1992), Renal injury from angiotensin II-mediated hypertension. *Hypertension*, 19: 464-474.

Jung O, Brandes RP, Kim IH, Schweda F, Schmidt R, Hammock BD, Busse R, Fleming I. (2005), Soluble epoxide hydrolase is a main effector of angiotensin II-induced hypertension. *Hypertension*, 45: 759-765.

Kaneto H, Morrissey J, McCracken R, Reyes A, Klahr S. (1994), Enalapril reduces collagen type IV synthesis and expansion of the interstitium in the obstructed rat kidney. *Kidney Int.*, 45: 1637-1647.

Katoh T, Lianos EA, Fukunaga M, Takahashi K, Badr KF. (1993), Leukotriene D4 is a mediator of proteinuria and glomerular hemodynamic abnormalities in passive Heymann nephritis. *J Clin.Invest.*, 91: 1507-1515.

K/DOQI clinical practice guidelines for chronic kidney disease: evaluation, classification, and stratification. (2002), *Am.J.Kidney Dis.*, 39: S1-266.

Keane WF. (1994), Lipids and the kidney. *Kidney Int.*, 46: 910-920.

Keseru B, Barbosa-Sicard E, Popp R, Fisslthaler B, Dietrich A, Gudermann T, Hammock BD, Falck JR, Weissmann N, Busse R, Fleming I. (2008), Epoxyeicosatrienoic acids and

the soluble epoxide hydrolase are determinants of pulmonary artery pressure and the acute hypoxic pulmonary vasoconstrictor response. *FASEB J*, 22: 4306-4315.

Khan SS, Kazmi WH, Abichandani R, Tighiouart H, Pereira BJ, Kausz AT. (2002), Health care utilization among patients with chronic kidney disease. *Kidney Int.*, 62: 229-236.

Klahr S, Levey AS, Beck GJ, Caggiula AW, Hunsicker L, Kusek JW, Striker G. (1994), The effects of dietary protein restriction and blood-pressure control on the progression of chronic renal disease. Modification of Diet in Renal Disease Study Group. *N.Engl.J.Med.*, 330: 877-884.

Krotz F, Riexinger T, Buerkle MA, Nithipatikom K, Gloe T, Sohn HY, Campbell WB, Pohl U. (2004), Membrane-potential-dependent inhibition of platelet adhesion to endothelial cells by epoxyeicosatrienoic acids. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.*, 24: 595-600.

Levey AS, Coresh J, Balk E, Kausz AT, Levin A, Steffes MW, Hogg RJ, Perrone RD, Lau J, Eknoyan G. (2003), National Kidney Foundation practice guidelines for chronic kidney disease: evaluation, classification, and stratification. *Ann.Intern.Med.*, 139: 137-147.

Levey AS, Greene T, Beck GJ, Caggiula AW, Kusek JW, Hunsicker LG, Klahr S. (1999), Dietary protein restriction and the progression of chronic renal disease: what have all of the results of the MDRD study shown? Modification of Diet in Renal Disease Study group. *J.Am.Soc.Nephrol.*, 10: 2426-2439.

Liu JY, Yang J, Inceoglu B, Qiu H, Ulu A, Hwang SH, Chiamvimonvat N, Hammock BD. (2009), Inhibition of soluble epoxide hydrolase enhances the anti-inflammatory effects of aspirin and 5-lipoxygenase activation protein inhibitor in a murine model. *Biochem.Pharmacol.*

Loch D, Hoey A, Morisseau C, Hammock BO, Brown L. (2007), Prevention of hypertension in DOCA-salt rats by an inhibitor of soluble epoxide hydrolase. *Cell Biochem.Biophys.*, 47: 87-98.

Ma LJ, Fogo AB. (2003), Model of robust induction of glomerulosclerosis in mice: importance of genetic background. *Kidney Int.*, 64: 350-355.

Manhiani M, Quigley JE, Knight SF, Tasoobshirazi S, Moore T, Brands MW, Hammock BD, Imig JD. (2009), Soluble epoxide hydrolase gene deletion attenuates renal injury and inflammation with DOCA-salt hypertension. *Am J Physiol Renal Physiol*, 297: F740-F748.

Manning PJ, Rokach J, Malo JL, Ethier D, Cartier A, Girard Y, Charleson S, O'Byrne PM. (1990), Urinary leukotriene E4 levels during early and late asthmatic responses. *J Allergy Clin.Immunol.*, 86: 211-220.

Meguid El NA, Bello AK. (2005), Chronic kidney disease: the global challenge. *Lancet*, 365: 331-340.

Michaelis UR, Fleming I. (2006), From endothelium-derived hyperpolarizing factor (EDHF) to angiogenesis: Epoxyeicosatrienoic acids (EETs) and cell signaling. *Pharmacol.Ther.*, 111: 584-595.

Michelassi F, Landa L, Hill RD, Lowenstein E, Watkins WD, Petkau AJ, Zapol WM. (1982), Leukotriene D4: a potent coronary artery vasoconstrictor associated with impaired ventricular contraction. *Science*, 217: 841-843.

Moorhead JF, Chan MK, El-Nahas M, Varghese Z. (1982), Lipid nephrotoxicity in chronic progressive glomerular and tubulo-interstitial disease. *Lancet*, 2: 1309-1311.

Nagata M, Kriz W. (1992), Glomerular damage after uninephrectomy in young rats. II. Mechanical stress on podocytes as a pathway to sclerosis. *Kidney Int.*, 42: 148-160.

Nasser SM, Patel M, Bell GS, Lee TH. (1995), The effect of aspirin desensitization on urinary leukotriene E4 concentrations in aspirin-sensitive asthma. *Am J Respir.Crit Care Med.*, 151: 1326-1330.

Node K, Huo Y, Ruan X, Yang B, Spiecker M, Ley K, Zeldin DC, Liao JK. (1999), Anti-inflammatory properties of cytochrome P450 epoxygenase-derived eicosanoids. *Science*, 285: 1276-1279.

Node K, Ruan XL, Dai J, Yang SX, Graham L, Zeldin DC, Liao JK. (2001), Activation of Galpha s mediates induction of tissue-type plasminogen activator gene transcription by epoxyeicosatrienoic acids. *J.Biol.Chem.*, 276: 15983-15989.

Ohkubo Y, Kishikawa H, Araki E, Miyata T, Isami S, Motoyoshi S, Kojima Y, Furuyoshi N, Shichiri M. (1995), Intensive insulin therapy prevents the progression of diabetic microvascular complications in Japanese patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus: a randomized prospective 6-year study. *Diabetes Res.Clin.Pract.*, 28: 103-117.

Ohtoshi K, Kaneto H, Node K, Nakamura Y, Shiraiwa T, Matsuhisa M, Yamasaki Y. (2005), Association of soluble epoxide hydrolase gene polymorphism with insulin resistance in type 2 diabetic patients. *Biochem.Biophys.Res.Commun.*, 331: 347-350.

Olearczyk JJ, Quigley JE, Mitchell BC, Yamamoto T, Kim IH, Newman JW, Luria A, Hammock BD, Imig JD. (2009), Administration of a substituted adamantyl urea inhibitor of soluble epoxide hydrolase protects the kidney from damage in hypertensive Goto-Kakizaki rats. *Clin.Sci.(Lond)*, 116: 61-70.

Oliw EH, Lawson JA, Brash AR, Oates JA. (1981), Arachidonic acid metabolism in rabbit renal cortex. Formation of two novel dihydroxyeicosatrienoic acids. *J.Biol.Chem.*, 256: 9924-9931.

Parrish AR, Chen G, Burghardt RC, Watanabe T, Morisseau C, Hammock BD. (2009), Attenuation of cisplatin nephrotoxicity by inhibition of soluble epoxide hydrolase. *Cell Biol.Toxicol.*, 25: 217-225.

Pfeffer MA, Burdmann EA, Chen CY, Cooper ME, de ZD, Eckardt KU, Feyzi JM, Ivanovich P, Kewalramani R, Levey AS, Lewis EF, McGill JB, McMurray JJ, Parfrey P, Parving HH, Remuzzi G, Singh AK, Solomon SD, Toto R. (2009), A Trial of Darbepoetin Alfa in Type 2 Diabetes and Chronic Kidney Disease. *N.Engl.J.Med.*

Pratt PF, Rosolowsky M, Campbell WB. (2002), Effects of epoxyeicosatrienoic acids on polymorphonuclear leukocyte function. *Life Sci.*, 70: 2521-2533.

- Radmark O, Samuelsson B. (2005), Regulation of 5-lipoxygenase enzyme activity. *Biochem.Biophys.Res.Commun.*, 338: 102-110.
- Remuzzi G. (1999), Cigarette smoking and renal function impairment. *Am.J.Kidney Dis.*, 33: 807-813.
- Remuzzi G, Bertani T. (1990), Is glomerulosclerosis a consequence of altered glomerular permeability to macromolecules? *Kidney Int.*, 38: 384-394.
- Remuzzi G, Bertani T. (1998), Pathophysiology of progressive nephropathies. *N.Engl.J.Med.*, 339: 1448-1456.
- Revermann M, Barbosa-Sicard E, Dony E, Schermuly RT, Morisseau C, Geisslinger G, Fleming I, Hammock BD, Brandes RP. (2009), Inhibition of the soluble epoxide hydrolase attenuates monocrotaline-induced pulmonary hypertension in rats. *J Hypertens.*, 27: 322-331.
- Ribeiro JD, Toro AA, Baracat EC. (2006), Antileukotrienes in the treatment of asthma and allergic rhinitis. *J.Pediatr.(Rio J.)*, 82: S213-S221.
- Roman RJ. (2002), P-450 metabolites of arachidonic acid in the control of cardiovascular function. *Physiol Rev.*, 82: 131-185.
- Ruggenti P, Perna A, Benini R, Bertani T, Zoccali C, Maggiore Q, Salvadori M, Remuzzi G. (1999), In chronic nephropathies prolonged ACE inhibition can induce remission: dynamics of time-dependent changes in GFR. Investigators of the GISEN Group. Gruppo Italiano Studi Epidemiologici in Nefrologia. *J Am Soc.Nephrol.*, 10: 997-1006.
- Ruggenti P, Perna A, Mosconi L, Pisoni R, Remuzzi G. (1998), Urinary protein excretion rate is the best independent predictor of ESRF in non-diabetic proteinuric chronic nephropathies. "Gruppo Italiano di Studi Epidemiologici in Nefrologia" (GISEN). *Kidney Int.*, 53: 1209-1216.
- Ruiz-Ortega M, Egido J. (1997), Angiotensin II modulates cell growth-related events and synthesis of matrix proteins in renal interstitial fibroblasts. *Kidney Int.*, 52: 1497-1510.
- Sato K, Emi M, Ezura Y, Fujita Y, Takada D, Ishigami T, Umemura S, Xin Y, Wu LL, Larrinaga-Shum S, Stephenson SH, Hunt SC, Hopkins PN. (2004), Soluble epoxide hydrolase variant (Glu287Arg) modifies plasma total cholesterol and triglyceride phenotype in familial hypercholesterolemia: intrafamilial association study in an eight-generation hyperlipidemic kindred. *J Hum.Genet.*, 49: 29-34.
- Schieppati A, Pisoni R, Remuzzi G. (2005), Pathophysiology and management of chronic kidney disease. Elsevier Saunders, Philadelphia, p. 444.
- Spanbroek R, Grabner R, Lotzer K, Hildner M, Urbach A, Ruhling K, Moos MP, Kaiser B, Cohnert TU, Wahlers T, Zieske A, Plenz G, Robenek H, Salbach P, Kuhn H, Radmark O, Samuelsson B, Habenicht AJ. (2003), Expanding expression of the 5-lipoxygenase pathway within the arterial wall during human atherogenesis. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, 100: 1238-1243.

- Spector AA, Fang X, Snyder GD, Weintraub NL. (2004), Epoxyeicosatrienoic acids (EETs): metabolism and biochemical function. *Prog.Lipid Res.*, 43: 55-90.
- Sun J, Sui X, Bradbury JA, Zeldin DC, Conte MS, Liao JK. (2002), Inhibition of vascular smooth muscle cell migration by cytochrome p450 epoxygenase-derived eicosanoids. *Circ.Res.*, 90: 1020-1027.
- Szczeklik A, Gryglewski RJ, Czerniawska-Mysik G. (1975), Relationship of inhibition of prostaglandin biosynthesis by analgesics to asthma attacks in aspirin-sensitive patients. *Br.Med.J.*, 1: 67-69.
- United States Renal Data System 2008. (2009), Annual Data Report Atlas of Chronic Kidney Disease and End-Stage Renal Disease in the United states. www.usrds.org/atlas.htm: 1.
- Valdivielso JM, Montero A, Badr KF, Munger KA. (2003), Inhibition of 5-lipoxygenase activating protein decreases proteinuria in diabetic rats. *J Nephrol.*, 16: 85-94.
- Wolf G, Wenzel U, Burns KD, Harris RC, Stahl RA, Thaiss F. (2002), Angiotensin II activates nuclear transcription factor-kappaB through AT1 and AT2 receptors. *Kidney Int.*, 61: 1986-1995.
- Yamamoto S, Suzuki H, Ueda N. (1997), Arachidonate 12-lipoxygenases. *Prog.Lipid Res.*, 36: 23-41.
- Yoshioka T, Rennke HG, Salant DJ, Deen WM, Ichikawa I. (1987), Role of abnormally high transmural pressure in the permselectivity defect of glomerular capillary wall: a study in early passive Heymann nephritis. *Circ.Res.*, 61: 531-538.
- Young RN. (1991), Development of novel leukotriene--based anti-asthma drugs: MK-886 and MK-571. *Agents Actions Suppl*, 34: 179-187.
- Yu HT. (2003), Progression of chronic renal failure. *Arch.Intern.Med.*, 163: 1417-1429.
- Yu Z, Davis BB, Morisseau C, Hammock BD, Olson JL, Kroetz DL, Weiss RH. (2004), Vascular localization of soluble epoxide hydrolase in the human kidney. *Am.J.Physiol Renal Physiol*, 286: F720-F726.
- Yu Z, Xu F, Huse LM, Morisseau C, Draper AJ, Newman JW, Parker C, Graham L, Engler MM, Hammock BD, Zeldin DC, Kroetz DL. (2000), Soluble epoxide hydrolase regulates hydrolysis of vasoactive epoxyeicosatrienoic acids. *Circ.Res.*, 87: 992-998.
- Zeldin DC. (2001), Epoxygenase pathways of arachidonic acid metabolism. *J Biol.Chem.*, 276: 36059-36062.
- Zhao X, Yamamoto T, Newman JW, Kim IH, Watanabe T, Hammock BD, Stewart J, Pollock JS, Pollock DM, Imig JD. (2004), Soluble epoxide hydrolase inhibition protects the kidney from hypertension-induced damage. *J Am Soc.Nephrol.*, 15: 1244-1253.
- Zou AP, Fleming JT, Falck JR, Jacobs ER, Gebremedhin D, Harder DR, Roman RJ. (1996), Stereospecific effects of epoxyeicosatrienoic acids on renal vascular tone and K(+)-channel activity. *Am J Physiol*, 270: F822-F83

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre, dass ich die dem Fachbereich Medizin der Joahnn Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main zur Promotionsprüfung eingereichte Dissertation mit dem Titel „In vivo Analyse der Rolle der löslichen Epoxidhydrolase in der Progression der Niereninsuffizienz bei der Maus“ im Institut für Kardiovaskuläre Physiologie unter Betreuung und Anleitung von Herrn Prof. Dr. med. Ralf Brandes ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation angeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Darüberhinaus versichere ich, nicht die Hilfe einer kommerziellen Promotionsvermittlung in Anspruch genommen zu haben.

Ich habe bisher an keiner in- oder ausländischen Universität ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht.

Die vorliegende Arbeit wurde bisher nicht als Dissertation eingereicht.

8 Lebenslauf

Persönliche Daten

Felix Jansen
Geb.: 11.08.1982 in Freiburg, Deutschland
Nationalität: deutsch

Ausbildung und Studium

- 10/2003 – 11/2009 **J. W. Goethe Universität, Frankfurt am Main**
Studium der Humanmedizin
1. Abschnitt der ärztlichen Prüfung: Note 2,0
2. Abschnitt der ärztlichen Prüfung: Note 2,0, Prüfung am 04.11.2009
Gesamtnote: 2,0
Befreiung von den vorübergehenden Studiengebühren aufgrund der Zugehörigkeit zu den leistungsbesten 20% der Studierenden
- Seit 03/2007 **Institut für Kardiovaskuläre Physiologie, J.W. Goethe Universität Frankfurt**
Tierexperimentelle Doktorarbeit mit Etablierung der 5/6 Nephrektomie bei der Maus und Untersuchungen zur Progressionshemmung der Niereninsuffizienz in diesem Modell
Die Ergebnisse werden momentan in 2 Manuskripten zusammengefasst und bald zur Publikation eingereicht
Einreichung der Dissertation für 01/2010 geplant
- 10/2006 – 03/2007 **Karls Universität, Prag, Tschechien**
Stipendiat des Erasmus-Socrates Austauschprogramms
Teilnahme an dem Englischsprachigen Studiengang
- 05/2004 – 07/2004 **Anatomisches Institut, J. W. Goethe Universität, Frankfurt am Main**
Tätigkeiten als **Hilfswissenschaftler, z.B.**
Studentenunterricht
- 09/1989 – 06/2002 **Freie Waldorfschule, Bremen**
Abitur: Note 1,3

Praktika und Famulaturen

- 10 – 12/2008 und **Klinikum Offenbach GmbH**

04 – 07/2009	Praktisches Jahr mit Wahlfach Radiologie
12/2008 – 03/2009	Kantonspital Luzern, Schweiz 4 monatiges Auslandstertial in der Inneren Medizin im Rahmen des Praktischen Jahres
08/2008 – 10/2008	AIMS Hospital Cochin, Indien 2 monatiges Auslandstertial in der Chirurgie im Rahmen des Praktischen Jahres
02/2008 – 03/2008	Kerckhoff Klinik, Bad Nauheim Famulatur in der kardiologischen Ambulanz
09/2007 – 10/2007	Princess Alexandria Hospital, University of Queensland, Brisbane, Australien Stipendiat des bvmd-Austauschprogramms Famulatur in der Nephrologie
08/2006 – 09/2006	St. Marien Krankenhaus, Frankfurt am Main Famulatur in der Anästhesie
03/2007 – 04/2007	Krankenhaus “Links der Weser”, Bremen Famulatur in der allgemeinen Inneren Medizin

Interessen und ausserstudentische Aktivitäten

09/2002 – 07/2003	Albert-Ludwigs-Universität, Freiburg Ableisten des Zivildienstes auf der neurologischen Station in der Kinderklinik der Albert-Ludwigs-Universität
1995 – 2002	Landesjugendorchester Bremen Mehrjährige Mitgliedschaft im Landesjugendorchester Bremen
weitere Interessen:	klassische Musik Fagott- und Gitarrenunterricht für mehrere Jahre Sport Laufen, Fußball, Ski, Tauchen, Tennis

Sprachen

Deutsch:	Muttersprache
Englisch:	fließend (mehrere Austauschprogramme und Auslandsaufenthalte)
Französisch:	fließend (10 Monatiger Aufenthalt während der Schulzeit)
Spanisch:	Grundkenntnisse