

Aus der V. Medizinischen Klinik
der Medizinischen Fakultät Mannheim
(Direktor: Prof. Dr. med. Krämer)

Langzeiteffekte von N-Octanoyl-Dopamin nach akutem ischämischen
Nierenversagen im Rattenmodell

Inauguraldissertation
zur Erlangung des medizinischen Doktorgrades
der
Medizinischen Fakultät Mannheim
der Ruprecht-Karls-Universität
zu
Heidelberg

vorgelegt von
Judith Christiane Henn

aus
Freiburg im Breisgau
2020

Dekan: Prof. Dr. med. Sergij Goerd
Referent: Prof. Dr. rer. nat. Benito A. Yard

INHALTSVERZEICHNIS

Seite

ABBILDUNGSVERZEICHNIS	1
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	2
1 EINLEITUNG	4
1.1 Akutes und chronisches Nierenversagen	4
1.1.1 Epidemiologie.....	5
1.1.2 Ätiologie	5
1.1.3 Prognose.....	6
1.1.4 Therapeutische Möglichkeiten.....	6
1.2 Tierexperimentelle Modelle	6
1.2.1 Warmischämiemodell.....	7
1.2.2 GFR-Abschätzung.....	7
1.3 Dopamin und N-Octanoyl-Dopamin (NOD)	8
1.3.1 NOD - Pharmakologie und präklinische Daten.....	9
1.4 Fragestellungen.....	9
2 MATERIAL UND METHODEN.....	10
2.1 Tierversuch.....	10
2.1.1 Wahl des Tiermodells.....	10
2.1.2 Tierhaltung	10
2.1.3 Gruppendesign und genereller Versuchsablauf	11
2.1.4 Operationsmethoden.....	12
2.1.5 Histologische Untersuchungen.....	13
2.1.6 Molekularbiologische Untersuchungen	14
2.1.7 Ausschlusskriterien	15
2.2 Zellkulturexperimente	15
2.2.1 Etablierung der Zelllinien.....	15
2.2.2 Versuchsdesign.....	16

2.2.3 Molekularbiologische Untersuchungen	17
2.3 Statistische Auswertung	17
3 ERGEBNISSE	18
3.1 Tierversuch.....	18
3.1.1 Auswirkungen auf die Gewichtsentwicklung.....	18
3.1.2 Auswirkungen auf die Nierenfunktion.....	18
3.1.3 Auswirkungen auf das Ausmaß der Fibrosierung.....	21
3.1.4 Auswirkungen auf die Expression proinflammatorischer Zytokine	22
3.2 Zellkulturexperimente	23
3.2.1 Reaktion von HUVECs auf die Stimulation mit TNF- α und NOD	24
3.2.2 Reaktion von PTECs auf die Stimulation mit TNF- α und NOD	25
4 DISKUSSION	26
4.1 Tierversuch.....	26
4.2 Zellkultur.....	30
4.3 Konkurrierende Therapieansätze und Pathophysiologie	32
4.4 Ausblick.....	33
5 ZUSAMMENFASSUNG.....	35
6 LITERATURVERZEICHNIS.....	36
7 LEBENS LAUF	49
8 DANKSAGUNG.....	50

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

	Seite	
Abb. 1	Strukturformel von Dopamin	9
Abb. 2	Strukturformel von N-Octanoyl Dopamin	10
Abb. 3	Studiendesign	13
Abb. 4	Gewichtsentwicklung der Versuchstiere über den Beobachtungszeitraum	21
Abb. 5	Entwicklung von Glomerulärer Filtrationsrate (GFR) und Kreatinin-clearance über den Beobachtungszeitraum	23
Abb. 6	Entwicklung der Proteinurie der Versuchsgruppen über den Beobachtungszeitraum	23
Abb. 7	Kumulative Häufigkeiten des Banff-Fibrose-Scores	24
Abb. 8	Repräsentative Ausschnitte Masson-Goldner Färbung (Vergrößerung 100x), grün gefärbte Anteile entsprechen Bindegewebe	25
Abb. 9	Expression proinflammatorischer Zytokine im Vergleich zu nativem Nierengewebe	26
Abb. 10	Expression proinflammatorischer Zytokine in humanen venösen Endothelzellen (HUVEC)	27
Abb. 11	Expression proinflammatorischer Zytokine in proximalen Tubulusepithelzellen (PTEC)	28

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

A.	Arterie
Abb.	Abbildung
ANV	Akutes Nierenversagen
BSA	Bovines Serumalbumin
ca.	circa
cDNA	<i>engl</i> complementary DNA (komplementäre DNA)
CKD	<i>engl</i> Chronic kidney disease (chronische Niereninsuffizienz)
COMT	Catechol-O-Methyltransferase
Cr-EDTA	Chrom-Ethylendiamintetraacetat
cT	<i>engl</i> cycle threshold (Schwellenzyklus, Kenngröße der quantitativen PCR)
CXCL1	Chemokinligand 1
d.h.	das heißt
DA	Dopamin
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	desoxy – Nukleotidtriphosphat
DPTA	Diethylentriaminpentaessigsäure
ED-1	CD68 (Glykoprotein auf der Membran von Zellen des Monozyten-Makrophagen-Systems)
ELISA	<i>engl</i> Enzyme linked immunosorbent assay, ein antikörperbasiertes Nachweisverfahren
ESRD	End stage renal disease (Endstadium der chronischen Niereninsuffizienz)
FCS	<i>engl</i> fetal calve serum, fetales Kälberserum
FITC-S	<i>engl</i> fluorescein isothiocyanate labelled sinistrin (Fluoreszein-Isothiocyanate markiertes Sinistrin)
GFR	Glomeruläre Filtrationsrate
HE	Hämatoxylin-Eosin
HO-1	Hämoxygenase 1
hpf	<i>engl</i> high power field (Hauptgesichtsfeld bei 400-facher Vergrößerung)
HUVEC	<i>engl</i> human umbilical vein endothelial cell (Endothelzellen aus humaner Nabelschnur)
i.p.	intraperitoneal
i.v.	intravenös
ICAM	<i>engl</i> Intercellular adhesion molecule (interzelluläres Adhäsionsmolekül)
IE	internationale Einheit
IL-6	Interleukin 6
IL-8	Interleukin 8
KDIGO	Kidney disease improving global outcome (gemeinnützige Organisation, die die Behandlung von Patienten mit Nierenerkrankungen verbessern möchte)
KG	Körpergewicht

min	Minute
ml	Milliliter
mRNA	<i>engl</i> messenger RNA (Boten-RNA)
NaCl	Natrium-Chlorid
NF- κ B	Nuclear Factor κ B
NF-H ₂ O	Nuklease freies Wasser
ng	Nanogramm
NOD	N-Octanoyl Dopamin
PCR	<i>engl</i> Polymerase chain reaction (Polymerasekettenreaktion)
PTEC	<i>engl</i> Proximal tubular epithelial cell (Proximale Tubulusepithelzellen)
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	<i>engl</i> Radical oxygen species (reaktive Sauerstoffspezies)
RT	Reverse Transcriptase
Tab.	Tabelle
TBS	Tris - buffered Saline
TE	Trypsin eluate
TE	Trypsin/ Ethylendiamintetraacetat (EDTA)
TNF- α	Tumornekrosefaktor alpha
TRPV1	Transient Receptor Potential Vanilloid 1 (transienter Rezeptor-Potential-Kationenkanal der Unterfamilie V (für Vanilloid))
VCAM	Vascular cell adhesion molecule (Vaskuläres Zelladhäsionsmolekül)
vs.	versus
z.B.	zum Beispiel
μ g	Mikrogramm

1 EINLEITUNG

1.1 Akutes und chronisches Nierenversagen

Das Akute Nierenversagen (ANV) wird durch eine plötzlich auftretende Einschränkung der Nierenfunktion definiert, die über die Messung der Serumkreatininkonzentration und die Urinproduktion objektiviert werden kann. Aktuell wird das ANV nach KDIGO (Kidney disease improving global outcome) in drei Schweregrade eingeteilt ^{1, 2}.

Schweregrad	Serum-Kreatinin	Urinproduktion
Grad I	Anstieg um $\geq 0,3$ mg/dl oder Erhöhung auf das 1,5-1,9-fache des Ausgangswertes	$< 0,5$ ml/kg/h für 6 -12 h
Grad II	Erhöhung auf das 2,0-2,9-fache des Ausgangswertes	$< 0,5$ ml/kg/h für ≥ 12 h
Grad III	Erhöhung auf das $\geq 3,0$ -fache des Ausgangswertes oder Anstieg auf $\geq 4,0$ mg/dl oder Beginn eines Nierenersatzverfahrens	$< 0,3$ ml/kg/h für ≥ 24 h oder Anurie für ≥ 12 h

Für diese Definition spielt die Ätiologie ebenso wenig eine Rolle wie die Frage nach einer vorbestehenden Nierenschädigung.

Aus einer Episode des ANV oder aufgrund anderer Noxen (bspw. Diabetes mellitus, arterielle Hypertonie) kann sich eine chronische Nierenfunktionseinschränkung entwickeln. Auch hier orientiert sich die Stadieneinteilung nach der National Kidney Foundation vorrangig an der exkretorischen Nierenfunktion, ermittelt über die glomeruläre Filtrationsrate (GFR) ^{3, 4}.

Stadium	GFR (ml/min/1,73m ²)
Stadium 1 (normale oder hohe Nierenfunktion)	≥ 90
Stadium 2 (milde Nierenfunktionseinschränkung)	60-89
Stadium 3a (milde bis moderate Nierenfunktionseinschränkung)	45-59
Stadium 3b (moderate bis schwere Nierenfunktionseinschränkung)	30-44
Stadium 4 (schwere Nierenfunktionseinschränkung)	15-29
Stadium 5 = ESRD* (Nierenversagen)	< 15

*ESRD= end stage renal disease

Darüber hinaus ermöglicht das Ausmaß der Albuminurie eine Einschätzung der Prognose vor allem im Hinblick auf die Gesamtmortalität, kardiovaskuläre Ereignisse und die Progression der Nierenerkrankung ⁴.

1.1.1 Epidemiologie

Das ANV gehört zu den häufigsten schwerwiegenden Komplikationen in der stationären Patientenversorgung. Je nach Erhebung sind 5-7% der Patienten betroffen mit steigender Tendenz ⁵⁻⁹, wobei insbesondere das ANV im Rahmen von operativen Eingriffen an Bedeutung zu gewinnen scheint ⁸. Gerade Operationen der Aorta bergen ein recht hohes Risiko für die Entwicklung eines postoperativen Nierenversagens, da das Abklemmen der Nierenarterien eine Ischämie-Reperfusionsschädigung bedingen kann ^{10, 11}.

Weltweit liegt die Prävalenz der chronischen Nierenerkrankung bei etwa 10-15 %, wobei der Großteil der Patienten eine moderate Nierenfunktionseinschränkung entsprechend Stadium 3 aufweist ^{12, 13}. Abgesehen davon, dass chronische Nierenerkrankungen mit erhöhter Mortalität und einem gesteigerten Risiko für kardiovaskuläre Ereignisse einhergehen ^{13, 14}, bedeutet diese Erkrankung für die Betroffenen eine erhebliche Verschlechterung der gesundheitsbezogenen Lebensqualität und Leistungsfähigkeit ^{15, 16}.

In den Industrieländern führt die Therapie von Patienten mit chronischem Nierenversagen zu einer hohen finanziellen Belastung des Gesundheitssystems. Insbesondere Nierenersatzverfahren, -transplantation und die Behandlung von Folgeerkrankungen sind für einen Großteil der Kosten verantwortlich, die durch chronische Nierenerkrankungen verursacht werden ^{17, 18}.

1.1.2 Ätiologie

Klassischerweise erfolgt die Einteilung des ANV in prä-, intra- und postrenale Ursachen, auch wenn diese Kategorien im Einzelfall überlappen und teilweise nicht strikt voneinander zu trennen sind. Je nach Untersuchung lassen sich bei den meisten Patienten prärenale Auslöser wie Dehydratation oder intrarenale Ursachen wie die toxisch bedingte Tubulusnekrose (nephrotoxische Medikamente, Röntgenkontrastmittel) und primäre glomeruläre Erkrankungen diagnostizieren. ANV nach Medikamenteneinnahme wird nicht einheitlich als intrarenal klassifiziert. Einige Autoren ordnen diese Ätiologie als prärenal ein, weswegen die Frage nach dem häufigsten ANV – prä- oder intrarenal – nicht eindeutig beantwortet wird¹⁹. Postrenal bedingtes ANV z.B. bei Uretersteinen ist deutlich seltener.

1.1.3 Prognose

Nach wie vor versterben viele Patienten, die ein ANV entwickeln, während des Krankenhausaufenthalts. Insbesondere dann, wenn Nierenersatzverfahren zur Anwendung kommen, liegt die Mortalität bei bis zu 50% ^{20, 21}.

Auch nach vermeintlich vollständiger Erholung der Nierenfunktion entwickelt ein beträchtlicher Anteil der Patienten im weiteren Verlauf eine chronische Nierenfunktionseinschränkung bis hin zu Dialysepflichtigkeit ²²⁻²⁶. Abhängig von der Schwere und Dauer des ANV erhöht sich das Risiko für die Entwicklung einer chronischen Nierenerkrankung des Stadiums 3 oder höher auf das 1,4 – 3,6 fache bezogen auf Patienten ohne ANV ^{22, 27}. Diese Risikoerhöhung besteht unabhängig von der Ätiologie des ANV auch bei jungen Patienten ²⁸.

1.1.4 Therapeutische Möglichkeiten

Trotz intensiver Forschung stehen bislang kaum prognoseverbessernde therapeutische Möglichkeiten für das ANV zur Verfügung. Es kommen einzig präventive Maßnahmen wie das Vermeiden nephrotoxischer Substanzen bei Risikopatienten oder eine ausreichende Hydratation vor Kontrastmittelgabe zum Einsatz ²⁹. Um das Voranschreiten der Nierenfunktionseinschränkung zu verhindern, stehen aktuell nur Allgemeinmaßnahmen wie eine gute Blutzucker- und Blutdruckkontrolle zur Verfügung ²⁶.

Tierexperimentelle Daten legen nahe, dass die Ischämiedauer des Nierengewebes maßgeblich das Ausmaß der Ischämie-Reperfusionsschädigung sowie des kurz- und mittelfristigen Outcomes bestimmt. Auch wenn sich dies für den Menschen noch nicht zweifelsfrei belegen ließ, wird im Rahmen von abdominalchirurgischen Eingriffen, die ein Abklemmen der Nierenarterien unumgänglich machen, eine möglichst kurze Ischämiezeit angestrebt ^{11, 30, 31}. Einige Substanzen wie Dopamin ³²⁻³⁴, die mit dem Ziel der Nephroprotektion eingesetzt wurden, erweisen sich in neueren Untersuchungen nicht nur als unwirksam, sondern sogar als tendenziell schädlich ^{29, 35}. Ähnliches gilt für Diuretika ³⁶⁻⁴⁵, Phosphodiesterasehemmer ⁴⁶⁻⁴⁸, Thyroxin ^{49, 50} und Adenosinrezeptorantagonisten ^{47, 51}. Die Beurteilung aller genannten therapeutischen Strategien wird dadurch erschwert, dass die Ätiologie des ANV das therapeutische Ansprechen maßgeblich beeinflusst und oft nicht sicher festgestellt werden kann.

Sofern die Patienten vital gefährdet sind, kommen Nierenersatzverfahren wie die Hämodialyse oder Hämofiltration zum Einsatz, wobei abgesehen von Patienten mit ANV nach operativen Eingriffen kein prognostischer Vorteil einer erhöhten Therapieintensität nachgewiesen werden konnte ^{52, 53}. Aktuell fehlt noch die klinische Evidenz für den prognostisch besten Zeitpunkt des Beginns von Nierenersatzverfahren ^{54, 55}.

1.2 Tierexperimentelle Modelle

Die vielfältigen Ursachen für die Entwicklung eines ANVs führten zur Etablierung verschiedenster Tiermodelle, jeweils mit dem Ziel, den zu Grunde liegenden Pathomechanismus möglichst realistisch darzustellen. Bei der Interpretation von

Versuchsergebnissen muss daher stets überprüft werden, ob das gewählte Tiermodell zur Bearbeitung der Fragestellung geeignet ist ⁵⁶.

Für Untersuchungen zur CKD müssen ähnliche Schwierigkeiten überwunden werden. Auch hier gibt es kein standardisiertes Tiermodell, welches alle Ätiologien der CKD abbildet⁵⁷. Neben der Ischämie-Reperfusionsschädigung werden auch Tiermodelle, die auf der Obstruktion der Ureteren ^{58, 59}, genetischen Defekten ⁶⁰ oder der Schädigung durch Nephrotoxine wie Cisplatin ⁶¹⁻⁶³ und Gentamicin ⁶⁴⁻⁶⁶ beruhen, untersucht. Nicht nur der Pathomechanismus der Schädigung beeinflusst die Entwicklung chronischer Nierenschädigung, sondern auch das Geschlecht der Versuchstiere wirkt sich auf den weiteren Krankheitsverlauf aus. So ließ sich für männliche Ratten eine erhöhte Vulnerabilität gegenüber Ischämie-Reperfusionsschäden nachweisen ^{67, 68}.

1.2.1 Warmischämiemodell

Um das ANV nach operativen Eingriffen des Bauchraumes und der Aorta zu simulieren, wurden in den vergangenen Jahren mehrere Warmischämiemodelle etabliert. Sie unterscheiden sich zum einen in der Ischämiezeit. Zum anderen liegt ein wesentlicher Unterschied darin, ob nur eine oder beide Nieren von der Blutversorgung abgeklemmt wurden und ob im Falle einer unilateralen Ischämie das nicht geschädigte Organ belassen oder entfernt wurde. Was die langfristigen Schäden betrifft kamen verschiedene Arbeitsgruppen bei vergleichbarem Vorgehen zu ganz unterschiedlichen Ergebnissen. Ein ANV dagegen wurde in allen beschriebenen Modellen zuverlässig ausgelöst^{56, 69-89}.

1.2.2 GFR-Abschätzung

Sowohl im klinischen Alltag als auch in der Forschung am Tiermodell stellt die korrekte Abschätzung der glomerulären Filtrationsrate eine Herausforderung dar. Aktuell wird vielfach auf Schätzformeln zurückgegriffen, in die mehrere Parameter wie Alter, Geschlecht, Körpergröße und -gewicht sowie die Laborparameter Kreatinin (Abbauprodukt von Kreatin, fällt vor allem in der Muskulatur an) und Cystatin C (Housekeeping Gen kernhaltiger Zellen mit vielfältigen Funktionen im Organismus) einfließen. Trotz aller Bemühungen die Validität dieser Formeln zu verbessern, geben sie häufig keine akkurate Auskunft über die Nierenfunktion ^{90, 91} und eignen sich nicht so gut, um bspw. in der Transplantationsmedizin die Organfunktion vorherzusagen wie die direkte GFR-Messung ⁹². Als Goldstandard wird daher meist die Messung der Inulin- oder Sinistrinexkretion herangezogen ⁹³. Es handelt sich bei beiden Stoffen um Fruktopolysaccharide mit endständigem Glukoserest unterschiedlicher Länge und Verzweigung. Die Durchführung letztgenannter Verfahren ist jedoch mit hohem zeitlichen und personellen Aufwand verbunden sodass sie im klinischen Alltag nur in speziell begründeten Einzelfällen zur Anwendung kommen ^{94,95}.

Gerade die weit verbreitete Kreatininclearance ist besonders fehleranfällig, obwohl dieser Stoff einige Eigenschaften aufweist, die ihn für die Abschätzung der GFR prädestinieren: Kreatinin wird mit einer weitestgehend konstanten Rate im Körper gebildet, frei filtriert und nicht tubulär resorbiert. Ein gewisser Teil des Kreatinins wird

jedoch tubulär sezerniert^{90, 96}, sodass gerade bei einer hochgradig eingeschränkten Nierenfunktion die Filtrationsleistung der Niere überschätzt wird⁹⁷. Darüber hinaus wirken sich auch Muskelmasse und Ernährung auf die Kreatininproduktion aus. Diese Einflussfaktoren werden in den gängigen Schätzformeln zwar berücksichtigt, trotzdem ermöglichen sie nur bei deutlich reduzierter Nierenfunktion eine annähernd korrekte Abschätzung der GFR⁹⁸⁻¹⁰⁰.

In der tierexperimentellen Erforschung akuter und chronischer Nieren-funktionseinschränkungen steht mit fluoreszenzmarkiertem Sinistrin (FITC-S) eine weitere Substanz zu Verfügung, um die GFR der Versuchstiere zu messen. FITC-S weist vergleichbare pharmakodynamische Eigenschaften und ein ähnliches Toxizitätsprofil wie nicht fluoreszenzmarkiertes Sinistrin auf^{94, 101}, sodass es als valider Marker für die Bestimmung der GFR herangezogen werden kann. Die Etablierung eines Verfahrens, mit dessen Hilfe die FITC-S Exkretion über die transkutane Messung der Fluoreszenz ermittelt werden kann, ermöglicht es, die GFR mit überschaubarem Aufwand und wenig Beeinträchtigungen für die Versuchstiere regelmäßig zu bestimmen¹⁰²⁻¹⁰⁴.

1.3 Dopamin und N-Octanoyl-Dopamin (NOD)

Das endogene Katecholamin Dopamin spielt nicht nur als Neurotransmitter im zentralen Nervensystem eine Rolle, sondern steigert in höheren Dosierungen den systolischen Blut- und Pulsdruck¹⁰⁵ und führt in niedrigeren Dosierungen zu einer Verbesserung von Nierendurchblutung und Steigerung der Diurese^{34, 106-108}. In der Vergangenheit wurde Dopamin zur Behandlung des ANV unter intensivmedizinischen Bedingungen häufig verwendet. Allerdings zeigten einige Publikationen für eine Therapie mit Dopamin bei Patienten im septischen Schock gegenüber der Therapie mit Noradrenalin eine erhöhte Mortalität und Inzidenz von Herzrhythmusstörungen^{109, 110}, sodass bei fehlendem Wirksamkeitsnachweis auf die Nierenfunktion im ANV in prospektiven Studien^{33, 111} seine Anwendung auf wenige Indikationen limitiert wurde.

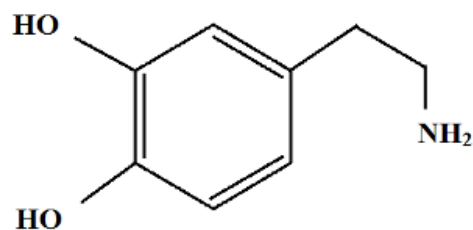


Abb. 1 Strukturformel von Dopamin

Untersuchungen im Bereich der Nierentransplantationen zeigten eine verbesserte Funktionsfähigkeit postmortaler Spenderorgane, wenn der Organspender im Rahmen der intensivmedizinischen Therapie vor der Organentnahme mit Dopamin oder Noradrenalin behandelt wurde¹¹²⁻¹¹⁴. Gerade für Dopamin konnte ein positiver Effekt nicht nur auf die Nierenfunktion in den ersten Tagen nach Transplantation, sondern auch auf die Herzfunktion¹¹⁵ nachgewiesen werden.

1.3.1 NOD - Pharmakologie und präklinische Daten

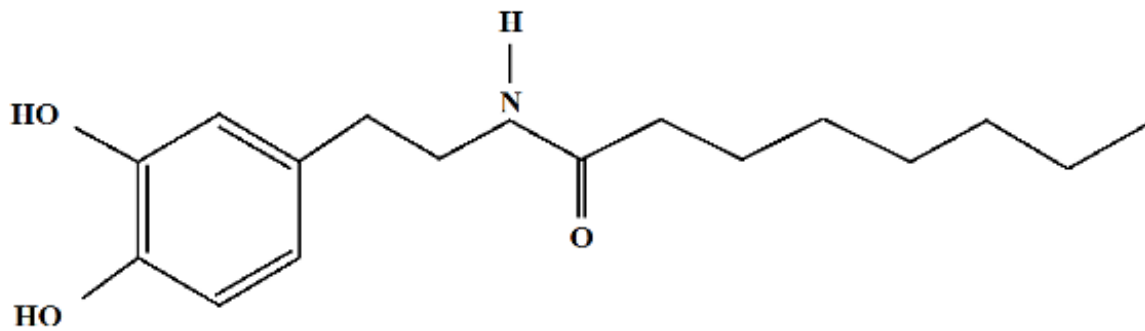


Abb. 2 Strukturformel von N-Octanoyl Dopamin

NOD ist ein Derivat des endogenen Katecholamins Dopamin, das sich aufgrund eines Octanoylrests am Stickstoffatom durch eine sehr hohe Lipophilie auszeichnet. Aufgrund des Alkylrestes interagiert es nicht im selben Ausmaß mit adrenergen und dopaminergen Rezeptoren wie die Ursprungssubstanz Dopamin und hat daher bei intravenöser Applikation keine hämodynamischen Effekte, wohingegen der protektive Effekt gegenüber Kältepräservierung bei HUVECs und Kardiomyozyten noch stärker ausgeprägt ist ^{116, 117} In einem Transplantationsmodell konnten bereits positive Effekte der Spenderbehandlung mit NOD auf die Nierenfunktion nachgewiesen werden.

1.4 Fragestellungen

Nach ersten vielversprechenden Experimenten zur Beeinflussung des ischämischen ANV durch NOD wollten wir im Rahmen eines Tierversuchs die Langzeitauswirkungen einer Therapie mit NOD auf die Progression des ANV untersuchen. Wenn NOD die Entwicklung der CKD verhindern bzw. abmildern könnte, dann könnte dessen Erprobung im Bereich abdominalchirurgischer Eingriffe an Risikopatienten für ein ANV diskutiert werden. Folgende Aspekte standen im Zentrum der Untersuchungen:

1. Kann die Behandlung mit NOD über 14 Tage nach ischämischer Schädigung die Entwicklung einer CKD positiv beeinflussen?
2. Welchen Einfluss hat die Dauer der Ischämiezeit auf die Effektivität der Behandlung?
3. Wie beeinflusst NOD in-vitro die Expression proinflammatorischer Zytokine in proximalen Tubulusepithelzellen und humanen Endothelzellen aus Nabelschnurvenen?

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Tierversuch

Nach der Genehmigung der Tierversuche durch das Regierungspräsidium Karlsruhe am 09.10.2015 mit dem Aktenzeichen 35-9185.81/G153/14 erfolgte die Versuchsdurchführung unter Beachtung des Tierschutzgesetzes in Zusammenarbeit mit dem Tierschutzbeauftragten der Fakultät.

Da ich selbst keine Berechtigung habe, Tierversuche durchzuführen, wurden die Experimente an den lebenden Tieren von einer Tiermedizinerin unserer Arbeitsgruppe durchgeführt. Sie hatte Experimente mit einem ähnlichen Versuchsaufbau bereits früher für Kurzzeituntersuchungen durchgeführt und stellte mir die entnommenen Organe sowie die gewonnenen Daten zu Stoffwechsellistung und Gewichtsentwicklung zur Verfügung. Die übrigen Experimente führte ich selbstständig durch.

2.1.1 Wahl des Tiermodells

Da sich zum Zeitpunkt der Planung des Experiments aus der Literatur kein klarer Hinweis auf ein zu präferierendes Tiermodell ergab¹¹⁸, wurde ein Warmischämiemodell mit kontralateraler Nephrektomie direkt im Anschluss an die Ischämie ausgewählt. Aufgrund des Einflusses männlicher Sexualhormone auf die Progression chronischer Nierenerkrankungen⁶⁸, wurden in unserem Warmischämiemodell männliche Lewis Ratten (LEW/Crl) verwendet. Mit diesem Modell hatten wir in unserer Arbeitsgruppe einige Untersuchungen zum ANV nach Ischämie-Reperfusionsschädigung durchgeführt und es hatte sich für diese Fragestellung als geeignet erwiesen^{119, 120}.

Da nur das ischämisch geschädigte linke Organ in situ belassen wurde, konnte mittels der FITC-S Exkretion die Funktion der ischämischen Nieren gemessen werden, ohne dass die Ergebnisse von der Filtrationsleistung des gesunden Organs verzerrt wurden. Da Unsicherheit darüber besteht, welche Ischämiedauer zuverlässig einen beträchtlichen chronischen Schaden hervorruft, wurden zwei Versuchsgruppen mit 45 bzw. 60 min Ischämiedauer gebildet.

2.1.2 Tierhaltung

Es kamen männliche Lewis Ratten (LEW/Crl) der Firma Charles River zum Einsatz. Zum Zeitpunkt des Kaufs wogen die Tiere 180-200g, zum Zeitpunkt der Operation etwa 250-300g.

Die Umweltbedingungen wurden über den gesamten Versuchszeitraum konstant gehalten (Lufttemperatur 21°C, Luftfeuchtigkeit 60%, Tag-Nachtrhythmus 12 h 8:00-20:00, Standarddiät und Wasser ad libitum). Die Tiere hatten vor Versuchsbeginn mindestens eine Woche Zeit, um sich an die Umgebung zu gewöhnen. Vor der Operation wurden die Ratten in Gruppen à fünf Tieren gehalten, postoperativ einzeln, um Wundheilungsstörungen zu vermeiden.

Alle 14 Tage sowie präoperativ wurden Stoffwechseluntersuchungen in einem speziellen Käfig durchgeführt. Dieser erlaubte es über 24 Stunden die Nahrungs- und Flüssigkeitszufuhr zu überwachen und ohne weitere Belastung für die Tiere Urin zu gewinnen. Zusätzlich wurden den Ratten im Rahmen dieser Untersuchungen Blutproben in Isoflurannarkose entnommen.

2.1.3 Gruppendesign und genereller Versuchsablauf

Um die ersten beiden Fragestellungen (s.1.4) zu bearbeiten, wurden vier Versuchsgruppen gebildet, die zwei unterschiedlichen Ischämiezeiten und Behandlungen (NOD vs. Natriumchlorid (NaCl) Lösung 0,9%) ausgesetzt wurden:

	Ischämiezeit	Behandlung	Gruppengröße
Gruppe 1	45 min	NaCl	10
Gruppe 2	45 min	NOD	10
Gruppe 3	60 min	NaCl	13
Gruppe 4	60 min	NOD	13

Die benötigte Gruppengröße wurde vor Beginn des Versuchs unter folgenden Annahmen ermittelt: Power 80%, α 0,05, Differenz zwischen den Mittelwerten 5. Da erfahrungsgemäß die Ausfallquote innerhalb der ersten fünf Tage bei Tieren, die 60 Minuten einer renalen Ischämie ausgesetzt wurden, ca. 30 % beträgt, wählten wir hier eine größere Anzahl an Tieren.

Vor Operationsbeginn wurde den Tieren Blut abgenommen. Im Anschluss an den chirurgischen Eingriff erfolgte die Implantation der osmotischen Minipumpe, über die NOD (7,5µg/kg/min) bzw. NaCl (10µl/kg/min) appliziert wurden. Am siebten postoperativen Tag wurde die Pumpe, deren Lebensdauer nur 7 Tage beträgt, gewechselt, sodass die Behandlung 14 Tage lang durchgeführt werden konnte.

Sowohl vor als auch an Tag 1 und Tag 3 nach der Ischämie wurde die GFR der Versuchstiere gemessen. Im Rahmen der Untersuchungen im Stoffwechselkäfig wurden Körpergewicht, Urinproduktion, Totalprotein im Urin, Kreatinin im Urin, Serumkreatinin und die GFR bestimmt. Das Studiendesign ist in Abbildung 3 graphisch dargestellt.

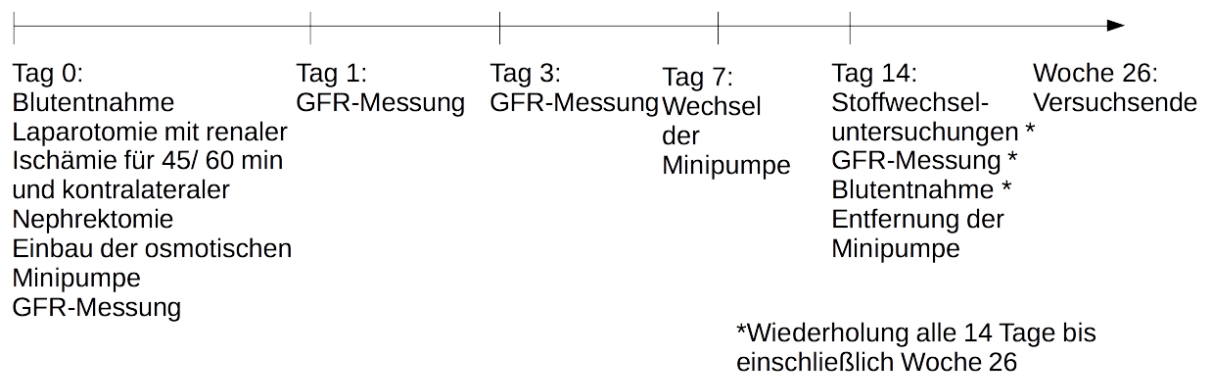


Abb. 3 Studiendesign

2.1.4 Operationsmethoden

Die Versuchstiere wurden mit Ketamin (100 mg/ml; Ketamin ®, IntervetDeutschland GmbH, Unterschleißheim, Deutschland) und Xylazin (6 mg/ml; Rompun ®, Bayer Health Care, Leverkusen, Deutschland) durch intraperitoneale Gabe narkotisiert. Die Aufrechterhaltung der Narkose erfolgte mit Isofluran 2-3% (Isofluran, Forene ®, Abbott GmbH & Co. KG, Wiesbaden, Deutschland). Während der Operation lagen die Tiere auf einer Wärmeplatte. Für Details zu dem operativen Vorgehen verweise ich auf bereits publizierte Daten¹¹⁹.

2.1.4.1 Warmischämiemodell

Unter dem Operationsmikroskop erfolgte zunächst eine Laparotomie und Präparation der Nierenarterien und -venen der linken Niere. Diese wurden mit atraumatischen Gefäßklemmen für 45 respektive 60 Minuten ligiert. Die korrekte Platzierung der Ligatur konnte durch die veränderte Farbe des Nierenparenchyms überprüft werden. Während der Ischämie lagen die Tiere weiterhin narkotisiert auf einer Wärmeplatte und wurden kontinuierlich überwacht. Um Flüssigkeitsverluste währenddessen zu vermeiden, wurde ein mit NaCl getränkter Tupfer in die Bauchhöhle gelegt. Nach Ablauf der Ischämiezeit wurden die Klemmen gelöst, die kontralaterale rechte Niere entnommen und die Bauchdecke nach Injektion von 2 ml NaCl verschlossen. Postoperativ wurden die Tiere mit Buprenorphinhydrochlorid (0,05mg/kgKG s.c.; Temgesic ®, Reckitt Benckiser Healthcare Ltd., Berkshire, United Kingdom) analgetisch behandelt.

2.1.4.2 Implantation der osmotischen Minipumpe

Direkt im Anschluss an die Warmischämiezeit wurde den Versuchstieren die osmotische Minipumpe (osmotic pump Model 2ML1, alzet, DURECT Corporation, Cupertino, California, USA) implantiert, die bereits 24 h vorher befüllt und in physiologischer NaCl-Lösung gelagert wurde. In der Nackenregion wurde eine Tasche präpariert, in die die Pumpe platziert wurde. Von dort ausgehend erfolgte die Präparation bis in die Inguinalregion sodass eine Verbindung mit dem dort gesetzten Hautschnitt hergestellt wurde. Der Katheter wurde durch diesen Hohlraum vorgeschoben, in die Vena femoralis gelegt und dort fixiert. Nachdem korrekte Lage und Funktion der Minipumpe gesichert waren, wurden die Hautschnitte verschlossen.

Nach sieben Tagen wurde die osmotische Minipumpe gewechselt. Für den Aggregatwechsel wurden die oben beschriebenen Schritte erneut durchgeführt.

2.1.4.3 GFR-Messung

Wie bereits beschrieben wählten wir ein recht neues Verfahren der GFR-Messung mit Hilfe der FITC-S Exkretion, um nicht auf Schätzformeln, die mit einer gewissen Unsicherheit behaftet sind, zurückgreifen zu müssen.

Für die transkutane Messung der FITC-S Exkretion zur Bestimmung der GFR wurde den Versuchstieren unter Isoflurananästhesie ein Fluoreszenzmessgerät auf dem

Rücken befestigt und die empfohlene Menge FITC-S intravenös appliziert. Nach einem Zeitraum von zwei Stunden, in dem sich die Tiere frei bewegen durften und somit keine Beeinflussung der Nierenfunktion durch Anästhetika zu befürchten war^{121, 122}, wurde das Gerät entfernt und ausgelesen. Aus der FITC-S Halbwertszeit ($t_{1/2}$) lässt sich nun die GFR mittels einer zuvor validierten Formel berechnen:

$$GFR \left[\frac{\frac{ml}{min}}{100gKG} \right] = \frac{31,26[ml/100gKG]}{t_{1/2} [min]}$$

Details bzgl. der verwendeten Geräte und des genauen Versuchsablaufs sind den entsprechenden Originalpublikationen zu entnehmen^{104, 123}.

2.1.5 Histologische Untersuchungen

Am Ende des Beobachtungszeitraums wurde den Versuchstieren die verbleibende linke Niere nach Entfernung der Nierenkapsel und Ligatur der versorgenden Blutgefäße über eine Laparotomie entnommen. Die Organe wurden für mindestens 24 Stunden in 4%iger gepufferter Formalinlösung fixiert. Anschließend erfolgte die Entwässerung in einer Alkoholreihe mit Lösungen absteigender Ethanol-Konzentrationen mit Xylol als Clearing reagent und die Einbettung in Paraffin in einem Autotechnikum (Leica, Deutschland). Aus den Paraffinblöcken wurden im Anschluss daran Schnitte von 4 μ m Dicke angefertigt.

2.1.5.1 Masson-Goldner Färbung

Die Färbung der Paraffinschnitte führte das pathologische Institut der Universitätsmedizin Mannheim für uns durch. Dabei kam das dort verwendete Standardprotokoll der Masson-Goldner Färbung (Trichromfärbung mit Azophloxin, Orange G und Lichtgrün; Gegenfärbung der Kerne mit Eisenhämatoxylin) zum Einsatz.

2.1.5.2 Beurteilung der Histologie

Das Ausmaß der Fibrosierung wurde mit Hilfe des Scores für Fibrose bei chronischer Transplantatnephropathie, einem Teil der Banff-Klassifikation, gemäß folgender Einteilung bewertet¹²⁴.

Grad 0	keine interstitielle Fibrose und Tubulusatrophie (0-5% des Kortex)
Grad I	Milde interstitielle Fibrose und Tubulusatrophie (6-25% des Kortex)
Grad II	Moderate interstitielle Fibrose und Tubulusatrophie (26-50% des Kortex)
Grad III	Schwere interstitielle Fibrose und Tubulusatrophie (> 50% des Kortex)

Von jedem Versuchstier wurden 40 zufällige high power fields (hpf, Gesichtsfeld bei 400-facher Vergrößerung) an einem Auflichtmikroskop (BX51TF mit Okular WH10, beide von Olympus Deutschland GmbH Hamburg, Deutschland) beurteilt.

2.1.6 Molekularbiologische Untersuchungen

Ein Teil der entnommenen Niere wurde nach Entnahme in flüssigem Stickstoff schockgefrostet und stand für molekularbiologische Untersuchungen zur Verfügung. Das Expressionsprofil mehrerer proinflammatorischer Zytokine und Rezeptoren wurde auf RNA-Ebene untersucht.

2.1.6.1 Untersuchte Marker

Wie in den vorherigen Untersuchungen ¹²⁰ wurde die Expression von CXCL1 (Rn00578225_m1), E-Selectin (Rn00594072_m1), ICAM (Rn00564227_m1), IL-6 (Rn99999011_m1), TNF-alpha (Rn99999017_m1) und VCAM1 (Rn00563627_m1) untersucht. Als endogene Kontrolle diente β -Aktin (Rn006677869_m1).

2.1.6.2 RNA-Extraktion

Die RNA-Extraktion aus dem bei -80°C gelagerten Gewebe erfolgte nach Zerkleinerung mit einem Homogenisator (Janke und Kunkel Ultra Turrax T25, IKA Werke Staufen, Deutschland) nach einem etablierten Protokoll zur Isolation von RNA mit Hilfe von Trizol (Life Technologies, Inc., Rockville, MD, USA)¹²⁵. Diese Methode beruht auf der Lyse von Zellmembran und Kernmembran sowie der Denaturierung der Proteine durch Trizol (Monophasische Lösung aus Phenol und Guanidin-Isothiocyanat). Es schließt sich ein Trennungsschritt mit Chloroform an. Die RNA verbleibt in der wässrigen Phase und kann im weiteren Verlauf mittels Isopropanol gefällt, mit Ethanol gewaschen und in NF-H₂O (Nuklease freies Wasser) resuspendiert werden.

Die anschließende DNase-Behandlung (RNase free DNase I, Ambion, Woodward, Austin, TX, USA) gemäß Herstellerprotokoll schließt mögliche Verunreinigungen durch DNA aus. Diese würden zu falsch hohen Werte bei der Messung der RNA-Konzentration führen.

Um Qualität und Menge der isolierten RNA zu bestimmen, wurde die Absorption der Lösung bei 260 nm und bei 280 nm mit Hilfe einer Nanoquantplatte und dem dazu kompatiblen Tecan Infinite M200 (Tecan Trading AG, Schweiz) gemessen. Der Quotient aus der Absorption bei 260 nm und 280 nm, der einen Hinweis auf die Reinheit der Nukleinsäurelösung und Kontamination durch Proteine gibt ¹²⁶, wurde nur bei Werten über 1,8 akzeptiert. Andernfalls wurden RNA-Isolation und DNase-Behandlung wiederholt.

Bis zur Weiterverarbeitung wurde die RNA bei -80°C gelagert.

2.1.6.3 cDNA-Synthese

Zur Synthese von cDNA (komplementäre DNA), die für die nachfolgende Taqman PCR notwendig ist, wurde das High Capacity cDNA Reverse Kit (Thermo Fisher Scientific/Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland), dem Protokoll des Herstellers folgend, verwendet. Es wurden jeweils 1 μ g RNA in cDNA umgeschrieben.

2.1.6.4 Quantitative RT-PCR

Mit Hilfe der quantitativen RT-PCR (reverse Transkriptase PCR) kann die verstärkte oder verminderte Expression einzelner Gene (gene of interest) im geschädigten Nierengewebe in Vergleich zu gesundem Nierengewebe nachgewiesen werden. Als Referenzgen diente das Zytoskelettprotein β -Actin. Es kam eine TaqMan-PCR (TaqMan Fast Advanced Master Mix; Stepone Plus System) zur Anwendung. Alle Proben wurden als Triplikate gemessen.

2.1.6.4.1 $\Delta\Delta$ -cT Methode

Die $\Delta\Delta$ -cT Methode ermöglicht eine relative Quantifizierung der Genexpression¹²⁷. Es wird keine Aussage über die absolute Anzahl an Kopien gemacht, sondern die Expression des zu untersuchenden Gens wird in Verhältnis zu der des konstitutiv exprimierten Gens (sog. „housekeeping gene“) gesetzt. In einem nächsten Schritt wird dieses Verhältnis mit der Expression des zu untersuchenden Gens im Referenzgewebe verglichen. Auch hier wurde die Expression auf das „Housekeeping gene“ normalisiert. Mit Hilfe folgender Formel lässt sich berechnen, um welchen Faktor die Expression im untersuchten Gewebe im Vergleich zum Referenzgewebe abweicht.

$$2^{-((cT_{goi}-cTr)_{sample}-(cT_{goi}-cTr)_{reference})}$$

goi	gene of interest (zu untersuchendes Gen)
r	Referenzgen
sample	untersuchte Probe
reference	Referenzprobe
cT	threshold cycle (PCR-Zyklus, in dem das Fluoreszenzsignal einen zuvor festgelegten Schwellenwert überschreitet)

2.1.7 Ausschlusskriterien

Die Versuchstiere wurden täglich durch geschultes Personal beobachtet. Bei offensichtlichen Infektionen, Urämie, Apathie oder einem chronischen Nierenversagen mit einem Serumkreatininwert ab 5 mg/dl wurde das betroffene Tier aus dem Versuch ausgeschlossen.

Zwei Tiere aus der Gruppe, die nach 60-minütiger Ischämie mit NOD behandelt worden war, mussten wegen chronischen Harnwegsinfektionen ausgeschlossen werden. Ein Tier der Kontrollgruppe mit 45 Minuten Ischämie verstarb in Woche 20.

2.2 Zellkulturexperimente

2.2.1 Etablierung der Zelllinien

Alle in der vorliegenden Arbeit verwendeten Zelllinien wurden in Übereinstimmung mit dem vorliegenden Ethikantrag (2015-518N-MA) vom 24.02.2015 in unserem Labor

nach einem etablierten Protokoll isoliert. Die Arbeiten mit Zellen wurden ausnahmslos an einer für Zellkulturexperimente geeigneten Sicherheitswerkbank durchgeführt.

2.2.1.1 HUVEC

Die Isolation der Endothelzellen aus menschlicher Nabelschnur erfolgte weitestgehend gemäß einem lange bewährten Protokoll¹²⁸, das wir durch geringfügige Modifikationen an die Arbeitsabläufe in unserem Labor angepasst hatten und mit dem wir konstante Ergebnisse in Bezug auf die Ausbeute an HUVECs erreichen. Die Nabelschnur wurde nach Entbindung in einem sterilen Gefäß mit einem geeigneten Konservierungsmedium bei 4°C bis zur Zellisolation aufbewahrt. Die Zeit bis zur Isolation war so kurz wie möglich. Anschließend wurden die Endothelzellen mit Hilfe von Kollagenase (Sigma Product No. C-9263, collagenase from *C. histolyticum*, Sigma Aldrich USA) isoliert. Die weitere Kultivierung der Zellen erfolgte in Gelatine (Gelatin from porcine skin, Fluka, Steinheim Deutschland) beschichteten Zellkulturflaschen (25 cm² BD Bioscience, Two Oak Park, Bedford USA; greiner bio one Cellstar, Filter Cap Cell Culture Flask) bei 37°C und 5%CO₂. Regelmäßiger Mediumwechsel (Provitro endothelial growth medium, FCS, advanced) sicherte eine ausreichende Nährstoffversorgung der Zellen, die nach Erreichen von 90-100 prozentiger Konfluenz passagiert oder für Versuche verwendet wurden.

2.2.1.2 PTEC

Wir erhielten Nierengewebe, das im Rahmen von Operationen angefallen ist, von der Urologischen Klinik der Universitätsmedizin Mannheim und isolierten daraus PTECs. Die Isolation erfolgte nach einem Protokoll von Detrisac et al¹²⁹ in Zellkulturflaschen, die zuvor mit 0,01%iger Kollagenlösung (Collagen from calf skin Product Number C 8919, Sigma Aldrich, USA) und FCS (Gibco lifetechnologies Darmstadt, Deutschland) beschichtet worden waren. In geeignetem, regelmäßig erneuertem Medium (DMEM/F-12, GlutaMAX™ supplement, ThermoFisher Scientific, zugesetzt Hydrocortison, Natriumselenit, Transferrin, Triiodthyronin, Insulin, alle SigmaAldrich und Epidermal growth factor, Peprotech) wuchsen die Zellen bei 37°C und 8% CO₂ aus und erreichten nach etwa 7 Tagen Konfluenz, worauf hin sie passagiert werden konnten.

2.2.2 Versuchsdesign

Alle Versuche wurden sowohl an PTECs als auch an HUVECs durchgeführt, die bereits drei bis fünf Mal passagiert worden waren.

2.2.2.1 Quantitative Analyse der mRNA-Expression

Auf Grundlage eines geeigneten Mediums wurden Lösungen mit NOD (Novaliq GmbH, Heidelberg, Deutschland), TNF- α (recombinant human TNF- α , Peprotech, New Jersey USA) oder beiden Substanzen hergestellt. Pro Experiment wurde jeweils ein T-25

Flask mit 5 ml einer Lösung stimuliert. Als Kontrolle diente die Inkubation mit geeignetem Medium. Am folgenden Morgen wurde die RNA extrahiert. Um belastbare Ergebnisse zu generieren, wurde dieses Experiment drei Mal wiederholt.

2.2.3 Molekularbiologische Untersuchungen

Die Expression einiger proinflammatorischer Proteine wurden mittels quantitativer RT-PCR auf m-RNA Ebene untersucht.

2.2.3.1 Untersuchte Marker

Neben dem für Endothelzellen spezifischen Adhäsionsprotein VCAM1 (Hs 01003372_m1) untersuchten wir das Expressionslevel von IL-6 (Hs 00985639_m1), IL-8 (Hs 00174103_m1), E-Selectin (Hs 00174057_m1) und HO-1 (Hs 01110250_m1) nach Stimulation. Als endogene Kontrolle diente β -Actin (Hs 01060665_g1).

2.2.3.2 Quantitative Analyse der mRNA-Expression

Zur RNA-Extraktion inkubierten die Zellen für ca. 10 Minuten mit 1 ml Trizol pro T-25 Flask und anschließend wurde die Lösung in ein Eppendorfgefäß überführt. Die weiteren Schritte waren mit der geschilderten Vorgehensweise zur quantitativen RNA-Analyse im Tierversuch identisch.

2.3 Statistische Auswertung

Die Daten wurden als Mittelwert ggf. \pm Standardabweichung angegeben. Zur Ermittlung des Signifikanzniveaus der Expressionsniveaus im Zellversuch wurde nach Testung von Normalverteilung und Varianz ein Zweistichproben-t-Test durchgeführt. Die Entwicklung der Proteinurie und Kreatininclearance sowie die Expressionsniveaus im Tierversuch wurde mit Hilfe einer Varianzanalyse unverbundener Messwerte analysiert und, sofern multiple getestet wurde, nach Dunnett korrigiert.

Die Gewichtsentwicklung wurde mit einer Varianzanalyse mit verbundenen Messwerten adjustiert nach Tukey-Kramer untersucht.

Die statistische Auswertung der ordinal skalierten Daten, die bei der Auswertung der Immunhistochemie gewonnen wurden, erfolgte mit Hilfe eines Chi-Quadrattests und eines Trendtests.

Als statistisch signifikant gelten Unterschiede, sofern ein p-Wert $<0,05$ erreicht wird. Alle statistischen Analysen wurden mit SAS (Statistical Analysis System Version for Windows 9.4) durchgeführt.

3 ERGEBNISSE

3.1 Tierversuch

3.1.1 Auswirkungen auf die Gewichtsentwicklung

Die regelmäßige Kontrolle des Körpergewichts konnte eine deutliche Gewichtsabnahme in der ersten Woche nach Ischämie in allen Versuchsgruppen zeigen. Diese Gewichtsabnahme war in der Versuchsgruppe mit der 60-minütigen Ischämiezeit deutlich stärker ausgeprägt als in der Gruppe mit 45 Minuten renaler Ischämie. Dieser stärkere Gewichtsverlust glich sich bis zum Versuchsende wieder aus (Abb. 4). Die Behandlung mit NOD zeigte keinen Effekt hinsichtlich des Gewichtsverlaufs nach Ischämie.

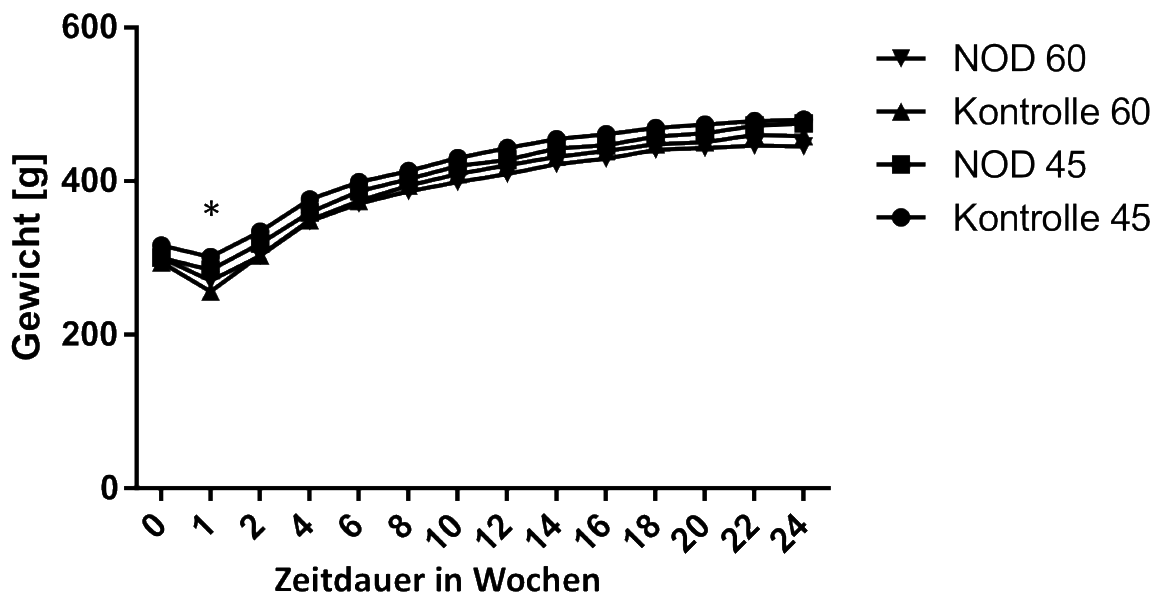


Abb. 4 Gewichtsentwicklung der Versuchstiere über den Beobachtungszeitraum

*Signifikant ($p < 0,001$) stärkere Gewichtsabnahme in Woche 1 der Kontrollgruppe mit 60 Minuten Ischämie im Vergleich zur Kontrollgruppe mit 45 Minuten Ischämie; Im Verlauf keine statistisch signifikanten Unterschiede der Gewichtsentwicklung NOD N-Octanoyl-Dopamin

3.1.2 Auswirkungen auf die Nierenfunktion

Wie erwartet verschlechterte sich die GFR nach der Induktion des akuten Nierenversagen deutlich. Nach etwa 2 - 4 Wochen stabilisierte sich die Filtrationsleistung in allen Gruppen bei etwas über der Hälfte der initialen GFR.

Während sich für die GFR keine Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen zeigen ließen, fiel bereits nach zwei Wochen eine stärkere Proteinurie in der Kontrollgruppe

mit 60 min Ischämie in Vergleich zur 45 min Kontrollgruppe auf. Dieser Unterschied verstärkte sich zum Ende der Beobachtung hin. Der Vergleich der mit NOD behandelten Tiere mit ihrer jeweiligen Kontrollgruppe ergab ein gemischtes Bild: Während die behandelte Gruppe der kürzeren Ischämiedauer zwischenzeitlich weniger Protein über den Urin verlor, konnte dieser Effekt für die Gruppen mit 60-minütiger Ischämie nicht nachgewiesen werden. (Abb. 5,6)

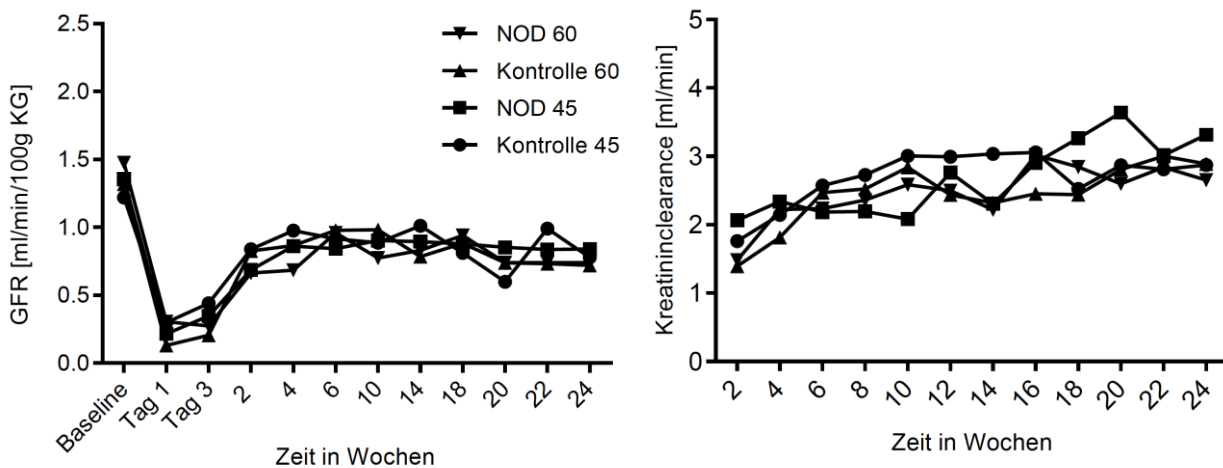


Abb. 5 Entwicklung von Glomerulärer Filtrationsrate (GFR) und Kreatininclearance über den Beobachtungszeitraum

Direkt nach der Ischämie mit Nephrektomie kommt es zu einem deutlichen Abfall der GFR. Nach zwei Wochen hat sich diese erholt und verändert sich über den Beobachtungszeitraum nicht signifikant. Die Kreatininclearance bleibt über den Beobachtungszeitraum weitestgehend stabil. Die Korrelation der Parameter ist gering; NOD – N-Octanoyl-Dopamin

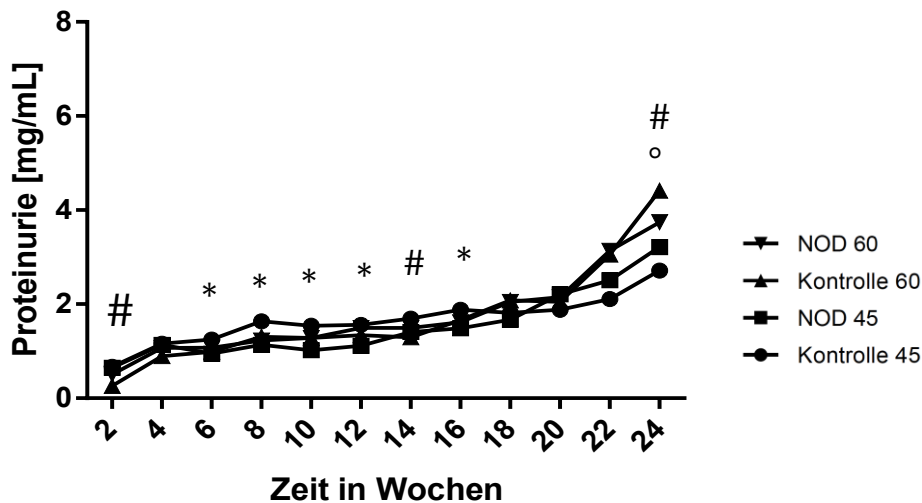


Abb. 6 Entwicklung der Proteinurie der Versuchsgruppen über den Beobachtungszeitraum

Nach der Ischämie steigt die Proteinurie in allen Gruppen kontinuierlich an. Zwischen der sechsten und achtzehnten Woche zeigen sich signifikante Unterschiede zwischen der mit NOD behandelten und Kontrollgruppe mit 45-minütiger Ischämiezeit. Zum Ende des Beobachtungszeitraums ist die Proteinurie der Kontrolltiere mit 60-minütiger Ischämie signifikant größer als die der Kontrolltiere mit 45-minütiger Ischämie.

* Proteinurie der Kontrollgruppe mit 45 Minuten Ischämie größer als Gruppe mit NOD und 45 Minuten Ischämie ($p < 0,05$); # Proteinurie der Kontrollgruppe mit 60 Minuten Ischämie größer als Kontrollgruppe mit 45 Minuten Ischämie ($p < 0,05$); ° Entwicklung der Proteinurie in Kontrollgruppe mit 60 Minuten Ischämie größer als in Kontrollgruppe mit 45 Minuten Ischämie ($p < 0,05$); NOD-N-Octanoyl-Dopamin

3.1.3 Auswirkungen auf das Ausmaß der Fibrosierung

Der Vergleich der beiden Kontrollgruppen zeigte eine ausgeprägtere Fibroseentwicklung der Tiere, die einer längeren Ischämiezeit ausgesetzt gewesen waren. Trotz des allgemein geringen Schädigungsausmaßes war dieser Unterschied statistisch hochsignifikant und die Korrelation zwischen Fibrosegrad und Ischämiedauer ließ sich in dem Trendtest zeigen. NOD scheint den fibrotischen Umbau des Nierengewebes nicht positiv zu beeinflussen (Abb. 7,8).

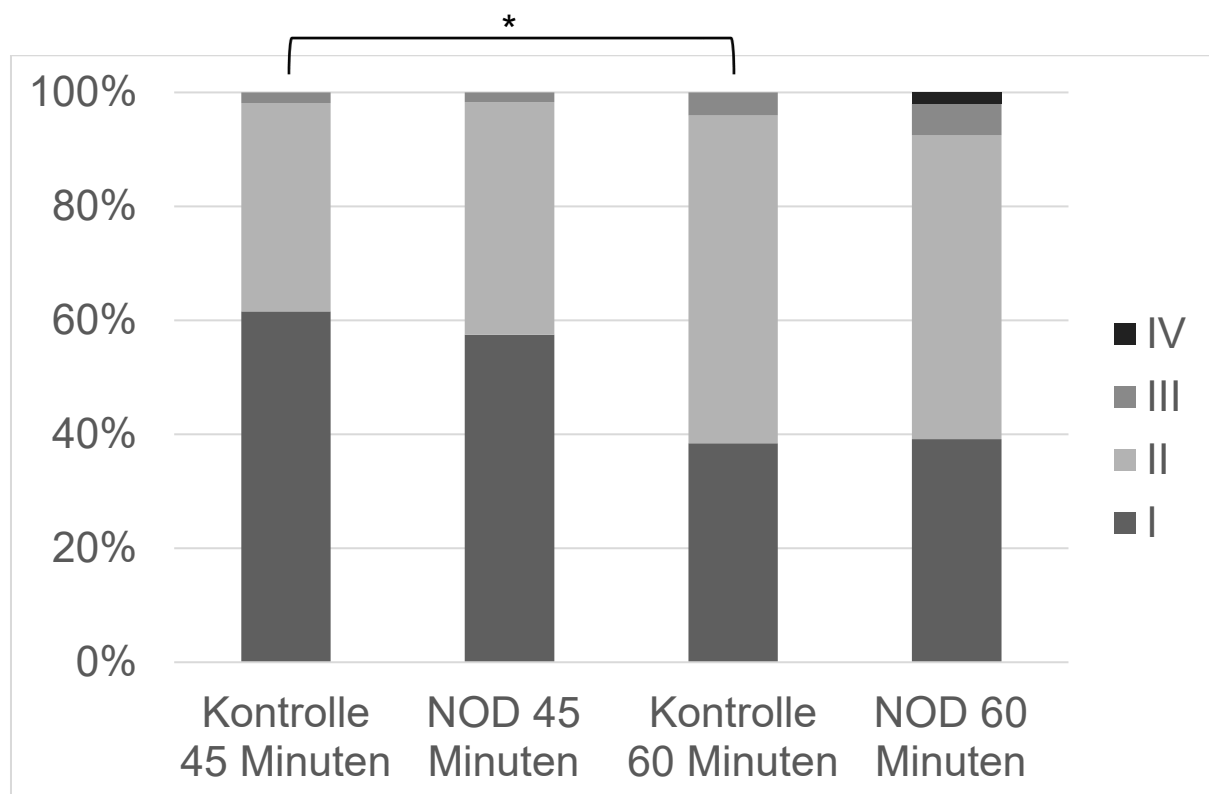


Abb. 7 Kumulative Häufigkeiten des Banff-Fibrose-Scores

Von jedem Versuchstier wurden 40 hpf (high power field) analysiert und das Ausmaß der Fibrose beurteilt (0-5% des Kortex °I, 5-25% °II, 25-50% °III, > 50% °IV). Es zeigte sich eine signifikant stärkere Fibrosierung bei den Kontrolltieren mit 60 Minuten Ischämie im Vergleich zu den Kontrolltieren mit 45 Minuten Ischämie.

Angaben in Prozent der untersuchten hpf; * $p < 0,001$ stärkere Fibrosierung Kontrollgruppe mit 60 Minuten Ischämie im Vergleich zur Kontrollgruppe mit 45 Minuten Ischämie

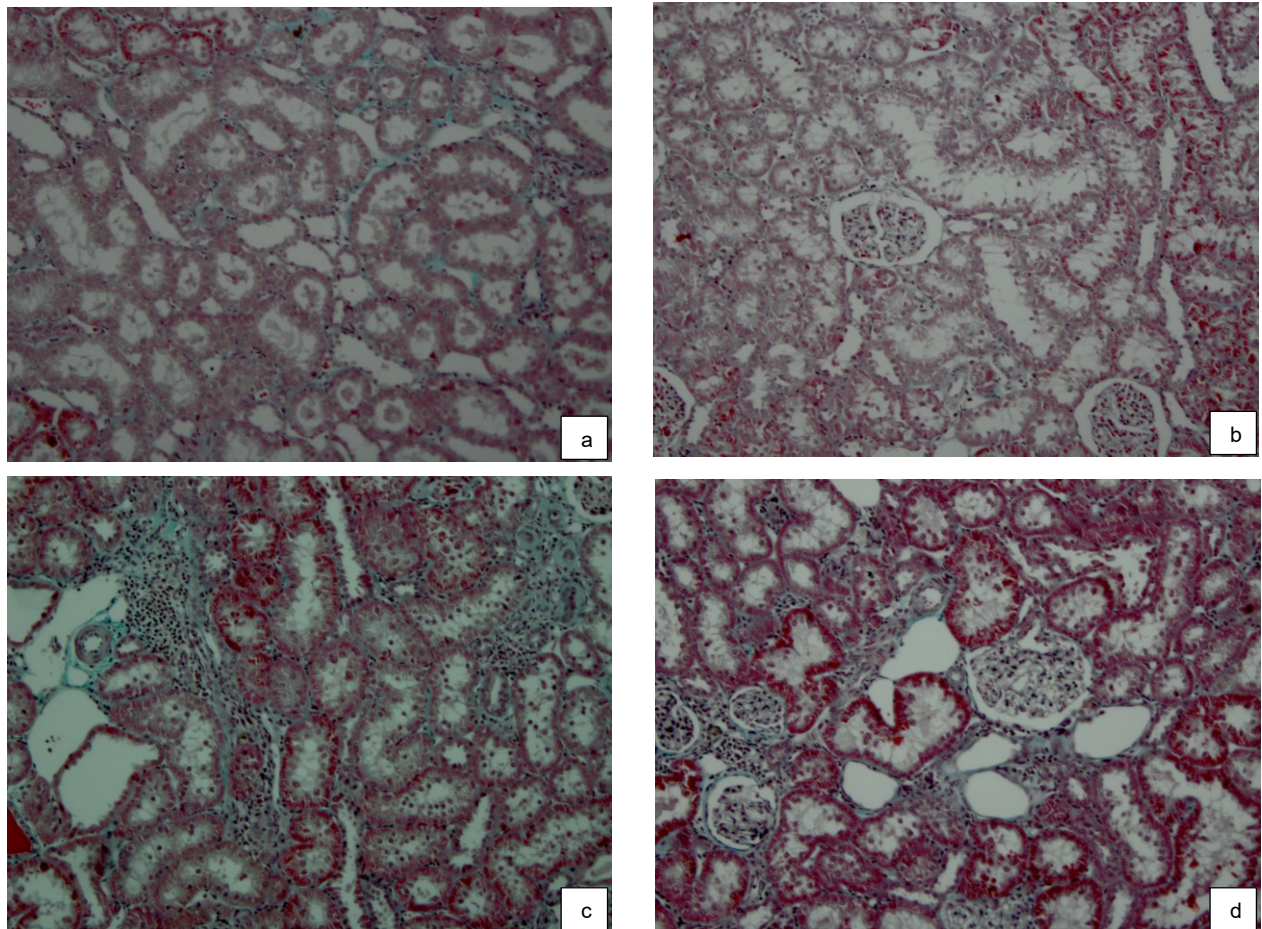


Abb. 8 Repräsentative Ausschnitte Masson-Goldner Färbung (Vergrößerung 100x), grün gefärbte Anteile entsprechen Bindegewebe

In der Kontrollgruppe mit 60 Minuten Ischämie fällt eine deutlich stärkere Fibrosierung des Nierengewebes im Vergleich zu der Kontrollgruppe mit 45 Minuten Ischämie auf. Dieser Unterschied ist über alle Versuchstiere hinweg hochsignifikant. Zwischen den anderen Versuchsgruppen besteht hinsichtlich der Fibrosierung des Nierengewebes nach 26 Wochen kein Unterschied.

a - Kontrollgruppe 45 min Ischämie, b - NOD-Gruppe 45 min Ischämie, c - Kontrollgruppe 60 min Ischämie, d - NOD-Gruppe 60 min Ischämie

3.1.4 Auswirkungen auf die Expression proinflammatorischer Zytokine

In wesentlichen zeigten alle vier Versuchsgruppen 26 Wochen nach Induktion des ischämischen Nierenversagens eine vergleichbare Expression der proinflammatorischen Zytokine CXCL1, ICAM, E-Selectin, IL-6, TNF- α und VCAM (Abb. 9). Einzig die Expression von ICAM war in der Kontrollgruppe mit 45 Minuten Ischämie stärker ausgeprägt als in der mit NOD behandelten Gruppe. Das Expressionsniveau lag jedoch auch signifikant über dem in der Kontrollgruppe mit 60-minütiger Ischämie. Aufgrund der starken Streuung der Ergebnisse der Expressionsanalysen scheint dieses Teilergebnis eher ein Zufallsbefund ohne Relevanz zu sein.

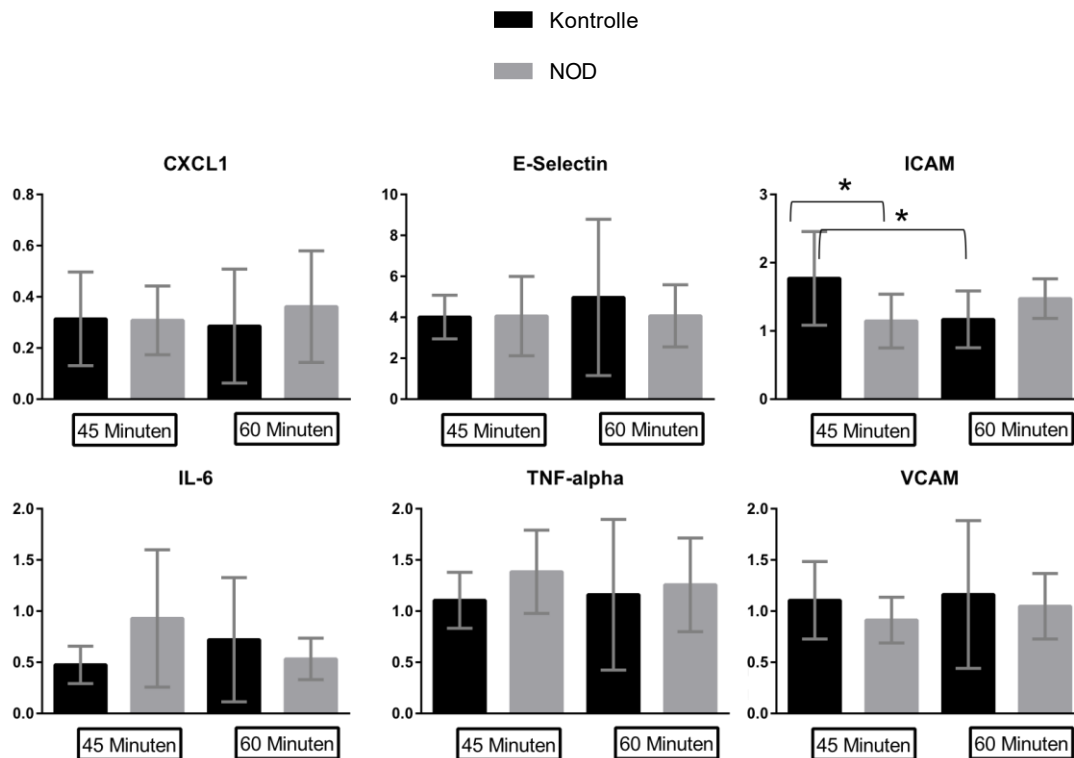


Abb. 9 Expression proinflammatorischer Zytokine im Vergleich zu nativem Nierengewebe

Mit Ausnahme von ICAM gibt es keine signifikanten Unterschiede im Expressionsniveau zwischen den Versuchsgruppen, dieser ist bei der starken Streuung der Werte als nicht relevant zu erachten

KON – Kontrolle, NOD - N-Octanoyl-Dopamin, CXCL1 - Chemokinligand 1,

ICAM - interzelluläres Adhäsionsmolekül, IL-6 - Interleukin 6,

TNF-alpha - Tumornekrosefaktor alpha, VCAM - vaskuläres Zelladhäsionsmolekül

* $p < 0,05$

3.2 Zellkulturexperimente

Um die Effekte von Inflammation und der Behandlung mit NOD auf die Nierenfunktion besser zu verstehen, wurde die Antwort auf einen Entzündungsstimulus und die Gabe von NOD an zwei Zelllinien untersucht. PTEC spielen insbesondere in Bezug auf die exkretorische Nierenfunktion eine wesentliche Rolle, Endothelzellen im Bereich der kapillären Barriere. Da eine Zellkultur von humanem Nierenendothel nicht zu Verfügung steht, musste für diese Arbeit auf humane Nabelschnurendothelzellen zurückgegriffen werden, um das Verhalten von Nierenendothel zu simulieren. HUVECs sind die für die in-vitro Forschung am häufigsten verwendete Subpopulation und gelten als robustes Modell in der Erforschung von Angiogenese und Interaktion des Endothels mit seiner Umgebung¹³⁰. Auch die vorangegangenen in-vitro Experimente meiner Arbeitsgruppe waren an HUVECs durchgeführt worden, was sich günstig auf die Vergleichbarkeit der Ergebnisse auswirkt¹³¹.

3.2.1 Reaktion von HUVECs auf die Stimulation mit TNF- α und NOD

Die Stimulation mit TNF- α induzierte in HUVECs zuverlässig die Expression von VCAM und E-Selectin. Diese Reaktion konnte durch die Zugabe von NOD in ihrer Ausprägung gehemmt werden. Das als protektiv angesehene Enzym HO-1 wurde durch NOD induziert, ein Effekt den auch die zusätzliche Gabe von TNF- α nicht wesentlich beeinflusste. IL-6 und IL-8 wurden sowohl von TNF- α als auch NOD induziert, wobei erst die Kombination beider Stoffe eine signifikante Änderung in der Expression erbrachte (Abb. 10).

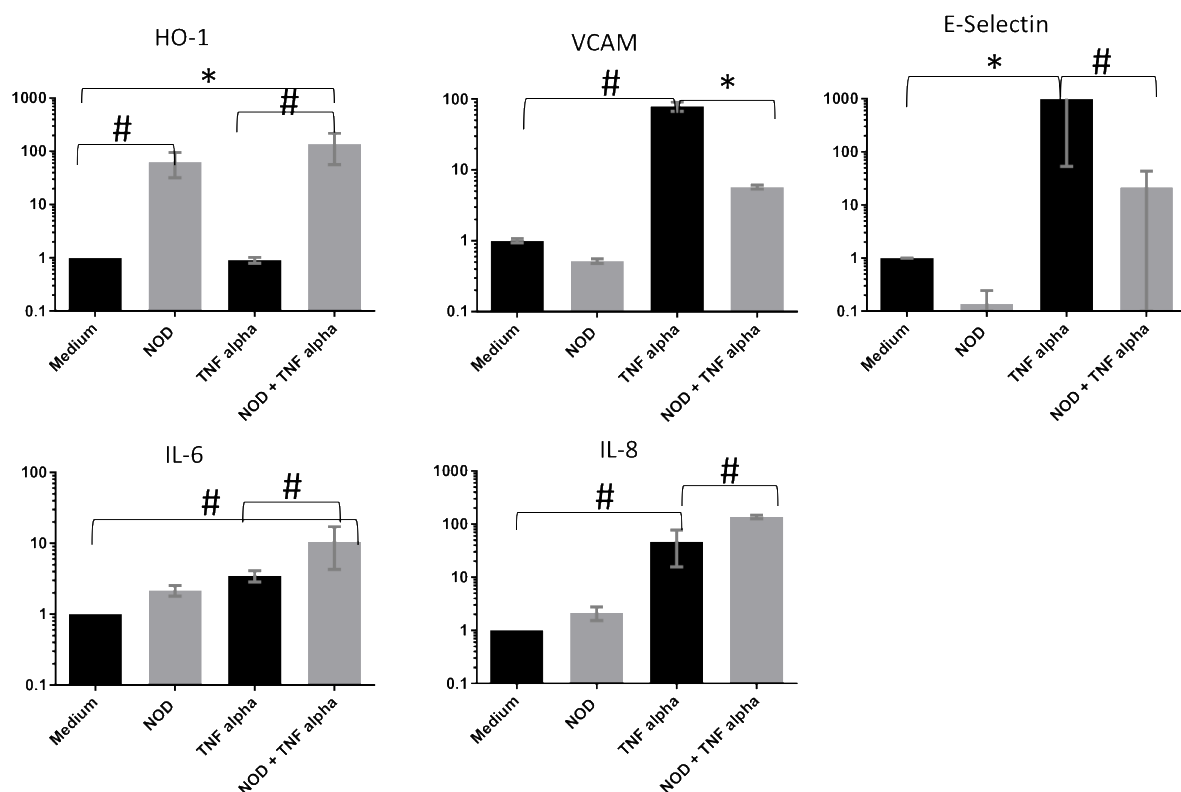


Abb. 10 Expression proinflammatorischer Zytokine in humanen venösen Endothelzellen (HUVEC)

Die Stimulation von HUVECs mit NOD führt zu Induktion von HO-1, in Kombination mit TNF- α auch zur Induktion von IL-6 und IL-8. Die Expression von VCAM und E-Selectin kann NOD auch bei Kostimulation mit TNF- α und NOD signifikant vermindern.

NOD - N-Octanoyl-Dopamin, HO-1 - Hämoxygenase 1, VCAM - vaskuläres Zelladhäsionsmolekül, IL-6 - Interleukin 6, TNF-alpha – Tumornekrosefaktor alpha; * $p < 0,001$; # $p < 0,05$

3.2.2 Reaktion von PTECs auf die Stimulation mit TNF- α und NOD

Auch in PTECs induzierte die Stimulation mit NOD die Expression von HO-1 unabhängig davon, ob zusätzlich mit TNF- α stimuliert wurde. Ebenso wurde die durch TNF- α induzierte VCAM Expression durch NOD reduziert und die IL-6 und IL-8 Expression durch beide Substanzen gesteigert (Abb. 11).

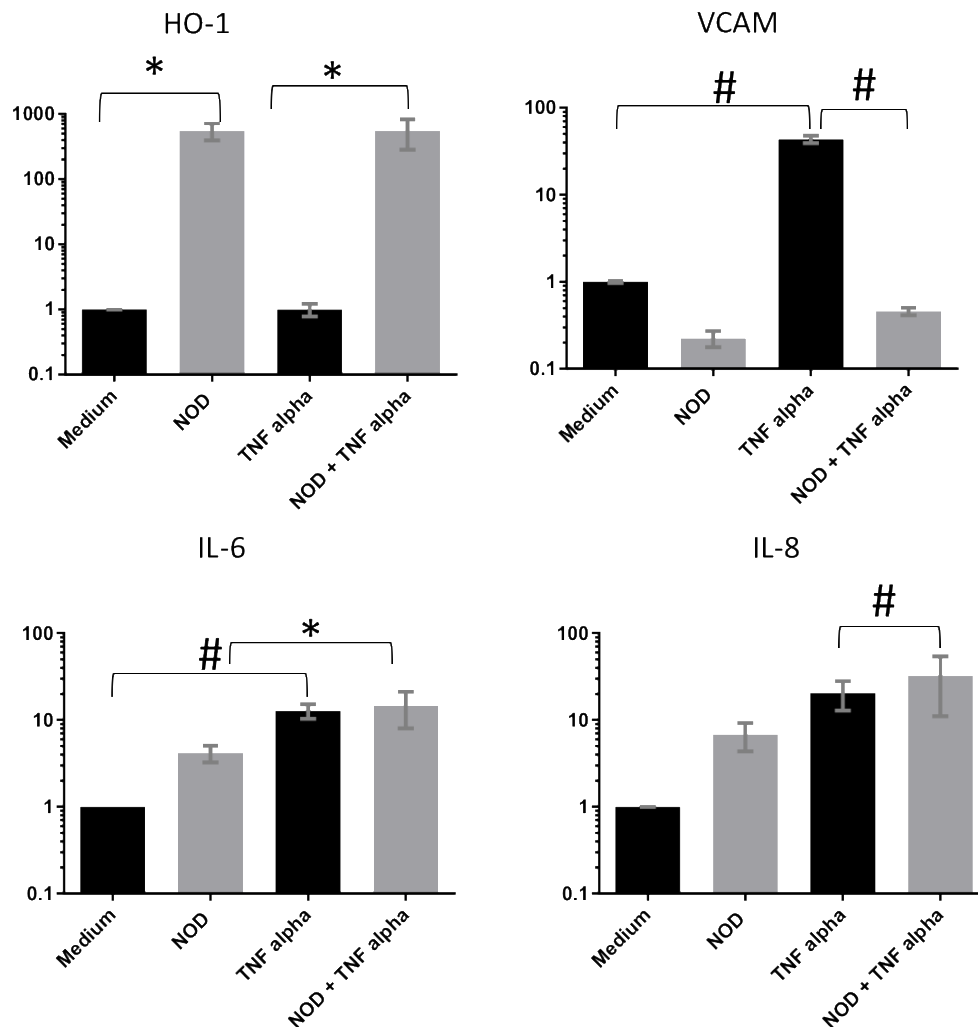


Abb. 11 Expression proinflammatorischer Zytokine in proximalen Tubulusepithelzellen (PTEC)

Die Stimulation von PTECs mit NOD führt zu Induktion von HO-1, in Kombination mit TNF- α auch zur Induktion von IL-6 und IL-8. Die Expression von VCAM kann NOD auch in Anwesenheit von TNF- α signifikant vermindern.

NOD - N-Octanoyl-Dopamin, HO-1 - Hämoxxygenase 1, VCAM - vaskuläres Zelladhäsionsmolekül, IL-6 - Interleukin 6, TNF-alpha - Tumornekrosefaktor alpha; * $p < 0,001$; # $p < 0,05$

4 DISKUSSION

In der vorliegenden Arbeit wurden die Auswirkungen einer Behandlung mit NOD und der Ischämiedauer auf den Verlauf der chronischen Niereninsuffizienz im Tiermodell untersucht. Die Dauer der Warmischämie hatte einen signifikanten Einfluss auf das Ausmaß der Fibrosierung in den Kontrollgruppen, obwohl diese in allen Gruppen unerwartet schwach ausgeprägt war. Die Behandlung mit NOD zeigte einen gewissen Effekt auf die Entwicklung einer Proteinurie. Diese war in der Placebogruppe mit 45-minütiger Ischämie stärker als in der Gruppe, die mit NOD behandelt wurde. Bedeutende Unterschiede der Nierenfunktion zwischen den Versuchsgruppen konnte ich nicht nachweisen.

Darüber hinaus wurden die Auswirkungen auf die Expression proinflammatorischer Zytokine durch die Stimulation verschiedener Zellpopulationen (HUVEC, PTEC) mit NOD auf RNA-Ebene untersucht. In beiden Zellreihen induzierte NOD die Expression von HO-1 und konnte die Expression von VCAM und E-Selectin (nur HUVEC) nach Stimulation mit TNF- α reduzieren. Nach Kostimulation mit NOD und TNF- α exprimierten die Zellen vermehrt IL-6 und IL-8.

4.1 Tierversuch

In unserer Studie kam ein Warmischämiemodell mit kontralateraler Nephrektomie zum Einsatz. Dieses ermöglichte uns, über transkutane GFR-Messung die Nierenfunktion der ischämisch geschädigten Niere zu untersuchen, ohne eine Beeinflussung der Werte durch das gesunde Organ befürchten zu müssen. Die direkte GFR-Messung hat den Vorteil potentielle Störfaktoren zu umgehen¹⁰³ und wir waren nicht von einem Surrogatparameter der Nierenfunktion^{91, 96, 97} (bspw. Serumkreatinin) abhängig. Korrelationsanalysen zwischen der Kreatininclearance und der direkt gemessenen GFR zeigen in unserer Untersuchung keine zuverlässige Korrelation. Da die Mehrzahl der Studien jedoch die errechnete Kreatininclearance als Maß für die Nierenfunktion verwendet, sollte die direkte Vergleichbarkeit unserer Studie mit diesen Ergebnissen zumindest kritisch hinterfragt werden.

Als die vorliegende Untersuchung geplant wurde, herrschte in der Fachliteratur noch Uneinigkeit darüber, welches Tiermodell am besten geeignet ist, um ein ischämisches Nierenversagen und dessen Auswirkungen auf die langfristige Nierenfunktion zu simulieren. Auch wenn es bereits Hinweise darauf gab, dass die kontralaterale Nephrektomie einen positiven Einfluss auf die Nierenfunktion hat⁷⁰, zeigten andere Arbeitsgruppen, dass auch in diesem Szenario durchaus mit einem relevanten Schaden zu rechnen ist^{72-74, 85}. Aus o.g. methodischen Gründen entschieden wir uns trotz der widersprüchlichen Studienlage für ein Modell mit unilateraler Warmischämie und kontralateraler Nephrektomie. 2016 veröffentlichten Le Clef et al. eine überzeugende Arbeit, in der sie den Einfluss der Temperatur auf die Progression der Nierenschädigung zeigten, und demonstrierten, welche robusten Ergebnisse die unilaterale Ischämie ohne kontralaterale Nephrektomie im Mausmodell liefert¹¹⁸. Diese Ergebnisse decken sich mit früheren Beobachtungen, denen zu Folge eine ausgeprägte Urämie vielfältige Auswirkungen auf die Expressionsmuster im Nierengewebe hat¹³²

und sowohl pro – als auch anti-inflammatorische Prozesse in Gang setzt. Hierbei scheint die Wirkung protektiver Enzymkaskaden beispielsweise rund um HO-1 den stärkeren Effekt auf den Langzeitverlauf von Nierenfunktion und histologische Veränderungen zu haben^{133, 134}.

Auf Grundlage dieser Beobachtungen untersuchten Kollegen aus der Arbeitsgruppe von Prof. Yard die Fibrosierung nach unilateraler Warmischämie ohne kontralaterale Nephrektomie. Der Anstieg der Retentionsparameter und auch der fibrotische Umbau des geschädigten Organs scheinen nur wenig ausgeprägter zu sein als in der vorliegenden Arbeit beschrieben¹³⁵. Hier zeigt sich wiederum, wie schwer Ergebnisse in einer anderen Spezies zu reproduzieren sind⁵⁷, wenngleich zu bedenken bleibt, dass die Körpertemperatur nicht engmaschig überprüft, sondern nur ein starkes Auskühlen verhindert wurde.

Ein wesentlicher Faktor für das Ausmaß der chronischen Schädigung nach Ischämie ist die Ischämiedauer¹³⁶. Vermutlich war die Ischämiedauer nicht lange genug, obwohl wir bereits zwei Versuchsgruppen gebildet hatten, um den Zeitfaktor mit in die Untersuchung einbeziehen zu können. Somit scheint es von enormer Wichtigkeit, zunächst ein robustes Tiermodell für langfristige Ischämie-Reperfusionsschäden zu etablieren, in dem idealerweise eine direkte GFR-Messung möglich ist und das nach überschaubarer Beobachtungszeit eine deutliche Fibrosierung sowie Einschränkung der Nierenfunktion hervorruft. Aus Praktikabilitätsgründen ist ein Rattenmodell vorzuziehen, weil die Gewebeausbeute hier größer ist als bei Mäusen, wodurch mehr Untersuchungen gleichzeitig möglich sind.

Ein weiterer Aspekt in der Entwicklung von akuten und chronischen Nierenfunktionsstörungen liegt in ihrer Beeinflussung durch Anästhetika. Zur Messung der GFR über die FITC-Sinistrin Exkretion legten wir Wert auf einen Versuchsaufbau, in dem die Messungen dann stattfanden, wenn die Tiere nicht narkotisiert waren, da frühere Untersuchungen nahe legten, dass während der Narkose mit einigen Substanzen die GFR vermindert ist^{121, 122}. Weitere Untersuchungen, gerade auch zu volatilen Anästhetika, konnten für diese ein anti-inflammatorisches Potential nachweisen. Im Rahmen der Sepsis ging dies jedoch nicht unbedingt mit einer verbesserten Nierenfunktion einher¹³⁷⁻¹³⁹. Auch die Modulation des AKI im Rahmen abdominalchirurgischer Eingriffe durch den Einsatz volatiler Anästhetika weist auf einen positiven Effekt durch die neuen, fluorierten Gase hin¹⁴⁰. Gleichwohl scheint dieser Effekt bei anderen Anästhetika ebenfalls aufzutreten und beispielsweise durch Propofol noch ausgeprägter zu sein¹⁴¹. Während diese Gesichtspunkte unter klinischen Gesichtspunkten zu begrüßen sind, erschweren sie die Etablierung eines robusten Tiermodells für AKI durch Ischämie-Reperfusionsschädigung. Denn operative Eingriffe ohne suffiziente Anästhesie sind aus ethischen Überlegungen heraus undenkbar.

Die standardisierte Beurteilung von Nierengewebe stellt eine weitere Herausforderung dar. Bereits 1991 wurde die Banff-Klassifikation entwickelt, um internationale Standards in der Beurteilung von Nierenbiopsien nach Allo-Transplantation zu etablieren und belastbare Daten über den Langzeiterfolg der Transplantationen zu generieren¹⁴². Diese Klassifikation schließt sowohl akute als auch chronische Abstoßungsreaktionen mit ein und erlaubt eine Einteilung in folgende Kategorien: hyperakute

Abstoßung, Borderline-Veränderungen, akute Abstoßungsreaktion, chronische Transplantatnephropathie sowie sonstige Veränderungen. Sowohl die akute Abstoßung als auch die chronische Transplantatnephropathie lassen sich in drei Schweregrade einteilen. In den vergangenen Jahren wurde die Banff-Klassifikation mehrfach überarbeitet¹⁴³ und um einige Faktoren ergänzt. Die Auswertungen dieser Studie beziehen sich auf die letzte Aktualisierung, die 2013 veröffentlicht wurde^{144, 145}.

Da in unserem Modell keine akuten Schäden im Sinne einer Abstoßungsreaktion zu erwarten waren, sondern unsere Untersuchung auf die Entwicklung einer renalen Fibrose nach ischämischer Schädigung abzielte, erhoben wir ausschließlich den Score für den Schweregrad der chronischen Transplantatnephropathie¹²⁴, wobei wir uns auf das Ausmaß der Fibrosierung beschränkten. Die visuelle Beurteilung von Trichromgefärbten Schnitten überzeugt durch ihre Effizienz, Reproduzierbarkeit und gute Korrelation mit der Nierenfunktion im Vergleich zu bspw. immunhistochemischer Kollagenfärbung oder Sirius Red Färbung¹⁴⁶.

Die tierexperimentellen Untersuchungen in der vorliegenden Arbeit konnten nicht den Nachweis erbringen, dass die Behandlung mit NOD nach ischämischer Nierenschädigung langfristig die Nierenfunktion positiv beeinflusst. Klotz et al. hatten gezeigt, dass die Behandlung mit NOD nach akutem ischämischem Nierenversagen zu statistisch signifikant niedrigeren Serum-Kreatinin-Spiegeln und geringerem Gewichtsverlust in den ersten fünf Tagen nach der Warmischämie führt¹²⁰. Dieser Effekt konnte nicht reproduziert werden. Auch auf die langfristige Nierenfunktion wirkte sich die Behandlung mit NOD nicht aus. Da der Beobachtungszeitraum mit 26 Wochen deutlich länger gewählt worden war, untersuchten wir die Tiere in größeren Abständen. Es ist nicht auszuschließen, dass wir eine passagere Nierenfunktionsverbesserung durch NOD deswegen nicht dokumentierten.

Zwischenzeitlich konnte in der Kontrollgruppe mit 45-minütiger Ischämie eine signifikant größere Proteinurie nachgewiesen werden. Eine hohe Proteinurie ist ein anerkannter Risikofaktor für die Progression einer Nierenfunktionseinschränkung^{147, 148}. Möglicherweise hätte man Unterschiede bei einem längeren Beobachtungszeitraum detektieren können. So konnten andere Autoren relevante Veränderungen der Nierenfunktion in einem ähnlichen Modell erst nach 40 Wochen nachweisen^{74, 85}.

In der vorliegenden Arbeit konnte ich bereits eine beginnende Fibrosierung nachweisen. Ein wichtiger Botenstoff im Rahmen dieser Entwicklung ist TGF- β ¹⁴⁹. Andere Arbeitsgruppen untersuchten neben proinflammatorischen Zytokinen wie IL-6 und E-Selectin auch das profibrotische Zytokin TGF- β ¹¹⁸. Unter Umständen wäre durch Expressionsanalysen dieses Proteins ein Effekt der Behandlung mit NOD bzw. einen stärkeren Einfluss der Ischämiedauer nachweisbar gewesen.

Die hier dargestellten Experimente bilden nur einen Teil der Forschung ab, welche in unserer Arbeitsgruppe zu den vielfältigen Wirkungen von NOD geleistet wird. Die Ergebnisse der Untersuchungen kommen teils zu diskrepanten Ergebnissen, auf die ich im Folgenden eingehen möchte.

Wie bereits angedeutet konnten Klotz et al.¹¹⁹ zeigen, dass nach 45-minütiger Ischämie und konsekutiver Behandlung mit NOD über 5 Tage die renale Inflammation

(gemessen an der Zahl ED-1⁺-Zellen) vermindert wird und sich die Nierenfunktion rascher erholt als in der Kontrollgruppe. Gleichzeitig verloren unter o.g. Behandlung die Tiere weniger an Gewicht. In einem ähnlich gelagerten Versuch¹²⁰ erhielten die Ratten kumulativ 670µg NOD aufgeteilt in je einen Bolus eine Stunde vor Beginn der Ischämie und kurz vor der Reperfusion. Hier konnte nur einen Tag nach dem Eingriff, nicht jedoch eine Woche später eine verminderte Infiltration ED-1⁺-Zellen nachgewiesen werden. Interessanterweise verhinderte NOD in dieser Untersuchung die Bildung apoptotischer oder nekrotischer Areale komplett. Bereits hier zeigen sich Hinweise darauf, dass der Zeitpunkt der therapeutischen Intervention massiven Einfluss auf die Ergebnisse hat.

Ähnlich konnte dies auch in Experimenten gezeigt werden, die sich mit den Auswirkungen einer Behandlung mit NOD in einem Transplantationsmodell beschäftigten. In einer ersten Untersuchung¹⁵⁰ wurden - analog zu positiven Erfahrungen der Spenderpräkonditionierung mit Dopamin - hirntote Ratten über sechs Stunden mit NOD (0,882 mg/kg/h) behandelt. Die Dosierung entsprach einer low-dose Dopamin Therapie. Wie erwartet verhielt sich NOD hämodynamisch neutral. Während die Behandlung keinen Effekt auf die Infiltration mit ED-1⁺-Zellen hatte, verbesserte sich die Nierenfunktion an Tag 1, die Expression der proinflammatorischen Zytokine ICAM und VCAM nahm ab und es wurden niedrigere Scores für Vaskulitis und Tubulitis erreicht. Ein zweites Experiment¹²⁰, in dem die Empfängertiere postoperativ über fünf Tage mit NOD behandelt wurde, zeigte jedoch weder eine Verbesserung der Nierenfunktion noch eine verringerte Gewichtsabnahme oder Beeinflussung der Expression proinflammatorischer Zytokine. Dies kann sowohl an der späteren Applikation als auch daran liegen, dass die Tiere mit einer deutlich niedrigeren Konzentration von NOD behandelt wurden und die Transplantatnieren einer 20-stündigen Kaltischämie ausgesetzt waren. Die Daten zu Spenderpräkonditionierung mit niedrig-dosiertem Dopamin legen jedoch nahe, dass Dosis und Applikationszeitpunkt die entscheidende Rolle spielen: Eine Gabe von Dopamin nach Transplantation hat keine positiven Effekte^{151, 152}, wohingegen die Behandlung der Spender sowohl die Notwendigkeit einer Hämodialyse reduziert als auch das Transplantatüberleben nach 5 Jahren verbessert^{114, 153}. Auf Grundlage dieser Daten fordern die Autoren die standardmäßige Behandlung hirntoter Spender mit Dopamin über mind. sieben Stunden¹⁵⁴.

Auf Grund seiner hohen Lipophilie diffundiert NOD deutlich besser in Zellen und Mitochondrien als bspw. Dopamin¹¹⁶. Da jedoch kein aktiver Transportmechanismus über die Zellmembran existiert, ist eine ausreichend hohe Konzentrationsdifferenz notwendig, um wirksame Konzentration intrazellulär über Diffusion zu erreichen. Diese liegt jedoch unter dem notwendigen Konzentrationsgradient, der für eine vergleichbare intrazelluläre Wirkung von Dopamin notwendig wäre. Im Gegensatz zu Dopamin ist NOD kein Agonist an Adrenorezeptoren, sodass keine hämodynamischen Auswirkungen zu befürchten sind und ohne kardiovaskuläre Nebenwirkungen hohe Dosen NOD appliziert werden können. Eine bessere Nierendurchblutung, welche auf einen Dopaminrezeptoragonismus am D1-Rezeptor in der glatten Muskulatur des Nierengewebes hinweisen würde, konnte nicht nachgewiesen werden^{119, 155}.

Eine tierexperimentelle Untersuchung zeigte, dass NOD in vivo sehr schnell in Leber und Nieren akkumuliert und dementsprechend insbesondere hepatisch und renal eliminiert wird. Diese pharmakokinetischen Aspekte könnten zumindest teilweise die widersprüchlichen Ergebnisse erklären, welche nahelegen, dass für eine relevante Wirkung eine recht hohe Dosis von NOD oder eine kontinuierliche Gabe notwendig sein dürfte¹⁵⁵, um eine therapeutische Konzentration im Zielgewebe zu erreichen.

4.2 Zellkultur

Bereits für eine Behandlung mit Katecholaminen von HUVECs konnten protektive Effekte nach Kaltpräservierung gezeigt werden und sowohl in HUVECs wie auch in PTECS konnte die Expression proinflammatorischer Zytokine nach Stimulation mit TNF α nach Behandlung mit Katecholaminen, insbesondere Dopamin reduziert werden. Vermutlich sind die Effekte auf die redox-aktive Katecholstruktur¹⁵⁶ und Hochregulation von HO-1¹⁵⁷ zurückzuführen. Dadurch kann NOD wie auch seine hämodynamisch wirksame Vorläufersubstanz eine antiinflammatorische Enzymkaskade in Gang setzen und bspw. HO-1 induzieren und NF κ B inhibieren^{116, 155}. Allerdings scheint auch die Aktivierung des TRPV-1 Rezeptors für die Effekte von Bedeutung zu sein, da TRPV1-negative Tiere auf eine Behandlung mit NOD nicht ansprachen¹⁵⁸. In-vitro konnten auch hemmende Einflüsse auf die Thrombozytenfunktion¹⁵⁹ und T-ZellProliferation¹⁶⁰ nachgewiesen werden. Ebenso induziert NOD die sog. Antwort auf ungefaltete Proteine, die mit einer verbesserten Kältetoleranz und einer verringerten Stoffwechselaktivität einhergeht¹³¹.

Auf Grundlage oben genannter Untersuchungen wurde ein besonderes Augenmerk auf Unterschiede zwischen PTEC und HUVEC in der Expression ausgesuchter proinflammatorischer Zytokine gelegt. HUVEC dienen hier als Modell für renales Endothel, da diese einfacher zu isolieren sind und über ähnliche Eigenschaften wie andere vasculäre Endothelzellen verfügen¹⁶¹. Durch die Arbeit sowohl mit Epithel- als auch Endothelzellen erhoffte ich mir Informationen über die Reaktion der verschiedenen Zelllinien auf die Stimulation mit NOD. Denn während Endothelzellen nach intravenöser Applikation direkt mit NOD in Kontakt kommen, ist im Rahmen der Exkretionsfunktion der Niere auch von einer Exposition des Tubuluepithels gegenüber NOD zu rechnen. Daher spielen mutmaßlich beide Zellreihen eine Rolle in der Reaktion auf NOD, wenn auch zeitversetzt. Diese Erkenntnisse könnten dabei helfen, die vielfältigen Ergebnisse der in-vivo Versuche besser zu verstehen. Gegensätzliche Muster in der Reaktion könnten bspw. die teilweise widersprüchlichen Ergebnisse in den Tierversuchen zu akuter und chronischer Schädigung erklären. In der vorliegenden Arbeit wurde, im Gegensatz zu vorherigen Untersuchungen, das Expressionsniveau von IL-6, IL-8, HO-1, VCAM und an HUVECs auch E-Selectin semiquantitativ auf RNA-Ebene bestimmt.

IL-6 gehört zu den wichtigsten Zytokinen im Rahmen der Immunantwort und wird bereits sehr früh in der Aktivierungskaskade durch vielfältige Proteine wie bspw. IL-1, TNF- α , Prostaglandine und Adipokine induziert und kann sowohl von Stromazellen als

auch Immunzellen produziert werden. Es spielt eine bedeutende Rolle in der Akut-Phase-Reaktion, in dem es die Zellen des angeborenen Immunsystems aktiviert und die Lymphozytenproliferation und -differenzierung fördert. Erst in letzter Zeit konnte nachgewiesen werden, dass IL-6 darüber hinaus auch für die Beendigung der Immunantwort des angeborenen Immunsystems eine wesentliche Rolle spielt^{162, 163}. In vitro konnte NOD die TNF- α vermittelte IL-6 Induktion nicht hemmen, es kam sogar zu einer weiteren Verstärkung der Expression von IL-6. Auch IL-8, welches nach Stimulation durch u.a. IL-1 und TNF- α ubiquitär produziert wird und eine selektive Chemotaxis von Neutrophilen sowie deren Degranulation bewirkt^{163, 164}, wird durch die Zugabe von NOD in höherem Ausmaß produziert als durch alleinige Stimulation der Zellen mit TNF- α . Während diese Teilergebnisse eine proinflammatorische Wirkung von NOD nahelegen, widersprechen dem unter anderem die Ergebnisse der übrigen in-vitro-Experimente: VCAM, welches insbesondere auf der Oberfläche von Endothelzellen, bei ausgeprägter Entzündung jedoch auch von anderen Geweben, exprimiert wird und die Leukozytenadhäsion und Transmigration vermittelt, wurde nach Zugabe von NOD deutlich herunterreguliert. Dies deckt sich mit den Ergebnissen von Klotz et al, dass die Infiltration mit ED1-Zellen nach der Behandlung mit NOD verringert ist. Da VCAM auch für Transplantatabstoßungen eine nicht zu vernachlässigende Rolle zu spielen scheint¹⁶⁵, lassen sich hiermit auch die positiven Ergebnisse in einem Transplantationsmodell unserer Arbeitsgruppe erklären¹⁵⁰. Auch E-Selectin, ein ausschließlich von Endothelzellen exprimiertes Lektin, das der Rekrutierung von Leukozyten des angeborenen Immunsystems dient¹⁶³, konnte durch NOD herunterreguliert werden. Somit scheint NOD gegensätzliche Effekte auf Entzündungsreaktionen zu haben: Während es lokal wirksame Faktoren wie VCAM und E-Selectin hemmt, verstärkt es die Induktion des systemisch wirksamen Zytokins IL-6 und des Chemokins IL-8 in Anwesenheit von TNF- α . Zum jetzigen Zeitpunkt konkurrieren verschiedene Theorien bzgl. des Wirkmechanismus von NOD. Sowohl eine Inhibition von NF κ B und Induktion von HO-1 als auch eine Wirkung über TRPV-1 Rezeptor legten in vitro Experimente bereits nahe. Weiterführende Untersuchungen von NOD und mehreren Derivaten legen nahe, dass die funktionellen Gruppen, die TRPV1 aktivieren, nicht für die antiinflammatorischen und immunoregulatorischen Effekte verantwortliche sind¹⁵⁵. Dennoch dürfte die Fähigkeit TRPV-1 zu stimulieren in vivo eine bedeutsame Rolle spielen, da TRPV1 in nahezu allen Geweben, insbesondere auch in der Niere, vorkommt und eine wichtige Rolle in der Entwicklung von Inflammation nach Ischämie-Reperfusionsschädigung spielt¹⁶⁶⁻¹⁶⁸. Die antiproliferative Wirkung auf T-Zellen vermittelt NOD vermutlich über die Redox-Aktivität seiner Catecholstruktur und inhibiert die Transkriptionsfaktoren NF κ B und AP1 (Activator protein 1), einem wichtigen Transkriptionsfaktor für Apoptose, Proliferation und Differenzierung^{169 170}.

Als Vorarbeit zu den hier beschriebenen Expressionsanalysen wurden Untersuchungen zur Stimulation von HUVECs und PTECs mit NOD mittels einem ELISA durchgeführt. Hier lag die Konzentration zunächst auf IL-6 und IL-8. Während die Experimente mit HUVECs recht gut reproduzierbare Ergebnisse hervorbrachten, schwankten die Resultate der Versuchsreihe mit PTECs enorm.

Seit vielen Jahren stellt die Etablierung reiner Zellreihen von proximalem Tubulusepithel eine große Herausforderung dar^{171, 172}. Doch auch innerhalb dieser Population lassen sich mehrere Subpopulationen mit unterschiedlichen Eigenschaften charakterisieren^{171, 173, 174}, welche nur durch aufwändige Verfahren separiert werden können. In unserem Labor isolieren wir Nierenepithel nach einem Protokoll von Detrisac et al¹²⁹. Hierbei entsteht eine Mischkultur aus proximalem und distalem Tubulusepithel. Die Anteile der beiden Zelltypen können zwischen zwei Isolationsvorgängen schwanken. Auf eine Aufreinigung der Subpopulationen proximaler Tubulusepithelzellen verzichteten wir bewusst, da das Zusammenspiel dieser in vivo von großer Bedeutung ist und eine Untersuchung einzelner Subtypen die Übertragbarkeit der Ergebnisse in in-vivo Modelle deutlich erschweren würde. Auf Grund dieser Besonderheiten ist die Bewertung der in-vitro Experimente an PTECs schwieriger als der Untersuchungen an HUVECs, welche eine homogene Zellpopulation bilden.

4.3 Konkurrierende Therapieansätze und Pathophysiologie

Das akute Nierenversagen gehört nach wie vor zu den häufigsten Komplikationen während eines Krankenhausaufenthaltes⁵⁻¹¹. Unterschiedliche Ätiologien bedingen verschiedene Pathomechanismen, weswegen sich die Ergebnisse einzelner Untersuchungen nicht direkt vergleichen lassen. Mit der Zunahme von Nierentransplantationen und größeren abdominalchirurgischen Eingriffen wuchs das Interesse an dem akuten ischämischen Nierenversagen und Ischämie-Reperfusionsschäden. Die Auswirkungen von Ischämie auf Zell- und Organebene sind inzwischen gut untersucht¹⁷⁵. Während der Ischämie kommt es auf Grund der Hypoxie zu einer intra- und extrazellulären Azidose, mitochondrialer Schädigung sowie zu einer Abnahme der Konzentration von ROS und Substanzen mit antioxidativem Potenzial. Während Endothelzellen sehr empfindlich auf eine Hypoxie reagieren, tolerieren Nierenepithelzellen diese teilweise besser, da sie bereits unter physiologischen Bedingungen Energie über anaerobe Stoffwechselwege bereitstellen¹⁷⁶. Mit Einsetzen der Reperfusion normalisieren sich pH und Sauerstoffgehalt im Gewebe sehr rasch. Dies führt über die Bildung ROS zu Schäden an Proteinen und DNA sowie auf Grund von Elektrolytverschiebungen, insbesondere der Ca^{2+} -Homöostase zu Zellschwellung und -tod sowie zunehmender mitochondrialer Schädigung. Als Folge dessen kommt es zur Gefäßschädigung mit verringerter renaler Durchblutung und glomerulärer Filtration sowie einer zunehmenden sterilen Inflammation. Die Einwanderung von Entzündungszellen verstärkt die endotheliale und epitheliale Dysfunktion sowie die erhöhte Vasopermeabilität. Dadurch aggraviert die Leukozytentransmigration das akute Nierenversagen¹⁷⁷. Die endotheliale Dysfunktion führt auch zu einer abnormen Expression von Gewebethromboplastin, wodurch vermehrt Mikrothromben entstehen. Dies wiederum verstärkt die Einwanderung von Entzündungszellen, Vasopermeabilität und Vasokonstriktion sodass ein Teufelskreis entsteht.

Auf Grundlage dieser pathophysiologischen Erkenntnisse untersuchten viele Arbeitsgruppen Möglichkeiten der Minderung Ischämie-Reperusions-bedingter Schäden.

Insbesondere eine Modulation der Entzündungsreaktion und Aktivierung der Schutzsysteme vor oxidativem Stress rund um die Hämoxygenase1 (HO-1) erwiesen sich hierbei als vielversprechend.^{82, 86, 178 69, 179 76, 81, 120, 180 66 61-64 181, 182.}

Publizierte Ergebnisse mit Untersuchungen an Dexmedetomidine¹⁸³, einem alpha-2 Agonist, Amifostin, einem Antioxidans¹⁸⁴, Celecoxib, einem COX-2 Hemmer¹⁸⁵, mesenchymalen Stammzellen⁸⁸ oder auch Substanzen, die gezielt die Mitochondrien vor oxidativem Stress schützen^{186, 187}, überzeugten allesamt durch gute Nephroprotektion. Die überwältigende Mehrheit der Arbeiten untersucht jedoch nur einen kurzen Zeitraum von maximal einer Woche. Dabei wären gerade im Hinblick auf Langzeitergebnisse nach Transplantationen oder nach akutem Nierenversagen langfristige Verbesserungen wichtig. Auch beim Menschen kommt es meist zu einer Erholung der Nierenfunktion und die chronische Niereninsuffizienz entwickelt sich nur schleichend²²⁻²⁶.

NOD hatte in einem Beobachtungszeitraum von 5 Tagen eindruckliche Effekte auf die Nierenfunktion und renale Inflammation. Trotzdem zeigte sich im Langzeitversuch keine Verbesserung der Nierenfunktion bzw. Reduktion der Fibrose durch die Behandlung mit NOD. Unter Berücksichtigung des oben skizzierten Pathomechanismus erscheint die kurzfristige Wirksamkeit von NOD nachvollziehbar: Durch Induktion von HO-1 sind mit NOD behandelte Zellen vor der plötzlichen Zunahme von ROS mit Einsetzen der Reperfusion besser geschützt, weswegen NOD offensichtlich besonders gut wirkt, wenn es vor Einsetzen der Ischämie-Reperfusionsschäden verabreicht wird. Mit seiner Catechol-Struktur wirkt NOD selbst antioxidativ. In vitro reguliert NOD VCAM und E-Selectin herunter und kann damit die Leukozytentransmigration und die Inflammation vermindern, wenngleich der in vivo Beweis hierfür noch aussteht¹²⁰. In vitro Experimente zeigten neben einer Hemmung der Proliferation aktivierter T-Zellen¹⁷⁰ auch eine verstärkte Expression von IL-8 und IL-6, dies jedoch nur bei einer Kostimulation mit TNF- α und NOD. Die in-vivo Relevanz dieser Effekte muss jedoch noch weiter untersucht werden. Möglicherweise sind sie für die unerwarteten Ergebnisse im Langzeitversuch mitverantwortlich.

4.4 Ausblick

Die Untersuchungen an NOD zeigten ein hohes antioxidatives und antiinflammatorisches Potential mit Verminderung der renalen Inflammation und Verbesserung der Nierenfunktion nach kurzfristiger Ischämie bzw. Transplantation. Im Langzeitmodell konnten diese Effekte nach akuter Ischämie nicht gezeigt werden bzw. wurden im Transplantationsmodell noch nicht untersucht.

Die Erkenntnisse in der Transplantationsmedizin legen Langzeiteffekte der Spenderpräkonditionierung mit Dopamin nahe. Hämodynamische Effekte limitieren hier teilweise dessen Einsatz, weswegen weitere Untersuchungen mit NOD von großem Interesse sind. Bei der Planung derartiger Untersuchung ist es von enormer Wichtigkeit auf eine ausreichend hohe Dosierung von NOD zu achten. Hierbei darf die rasche renale und hepatische Elimination von NOD sowie der enzymatische Abbau nicht außer Acht gelassen werden.

Für weitere Studien am akuten ischämischen Nierenversagen muss zunächst ein robustes Tiermodell mit ausgeprägter Schädigung im Langzeitverlauf etabliert werden, welches die kontinuierliche Überwachung der Nierenfunktion erlaubt. Im Anschluss daran könnten Untersuchungen mit längerem Applikationszeitraum oder Applikation von NOD vor Einsetzen der Ischämie neue Erkenntnisse zu Tage fördern. Gerade in der Abdominalchirurgie ließen sich Konzepte der prophylaktischen Gabe von NOD umsetzen und kämen einer großen Patientengruppe zu Gute.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Für das synthetische Dopaminderivat N-Octanoyl-Dopamin konnten positive Effekte auf die Nierenfunktion nach akuter Ischämie und nach Transplantation nachgewiesen werden. Dies wird auf antiinflammatorische und antioxidative Eigenschaften zurückgeführt. Im Anschluss an Beobachtungen über einen kurzen Zeitraum untersuchte ich die Langzeiteffekte einer Behandlung mit N-Octanoyl-Dopamin nach akutem ischämischen Nierenversagen mit einer Ischämiezeit von 45 bzw. 60 Minuten. Daran anschließend testete ich die in-vivo Effekte von N-Octanoyl-Dopamin auf Endothel- und proximale Tubulusepithelzellen.

Männliche Lewis Ratten wurden nach einer 45- bzw. 60- minütigen Ischämie für 14 Tage mit N-Octanoyl-Dopamin bzw. Placebo behandelt. Körpergewicht und Nierenfunktionsparameter wurden regelmäßig erhoben. Nach 26 Wochen wurden die Tiere getötet und das Nierengewebe histologisch und mittels RNA-Expressionsanalysen untersucht. Bei einem insgesamt geringen Ausmaß chronischer Schädigung und vergleichbarer Nierenfunktion in allen Versuchsgruppen konnte der Nachweis einer langfristigen Nephroprotektion durch N-Octanoyl-Dopamin nicht erbracht werden. Es zeigte sich lediglich eine Verminderung der Proteinurie über einen Teil des Beobachtungszeitraums. Die längere Ischämiedauer hatte keine Auswirkungen auf die Nierenfunktion führte jedoch zu einer ausgeprägteren Fibrosierung.

In-vitro induzierte N-Octanoyl-Dopamin die Expression von Hämoxygenase-1, einem wichtigen Enzym zum Schutz der Zellen vor oxidativem Stress. Die proinflammatorischen Proteine VCAM (vaskuläres Zelladhäsionsmolekül) und E-Selectin wurden durch N-Octanoyl-Dopamin auch nach Stimulation mit Tumornekrosefaktor alpha supprimiert. Überraschenderweise kam es bei der Ko-Stimulation mit Tumornekrosefaktor alpha zu einer verstärkten Expression von Interleukin 6 und 8, beides proinflammatorische Zytokine.

Die Ergebnisse dieses Tierversuchs stehen im Widerspruch zu den positiven Effekten von N-Octanoyl-Dopamin in kurzfristigen Beobachtungsstudien und Effekten in in-vitro Experimenten. Das durchweg geringe Ausmaß der Nierenschädigung erschwert eine Detektion der potentiellen Wirkung deutlich. Die Wirksamkeit von N-Octanoyl-Dopamin sollte nach der Etablierung eines robusten Rattenmodells für Ischämie-Reperfusionsschäden und weiteren pharmakokinetischen Untersuchungen zu Dosisfindung und Applikationsschema erneut untersucht werden.

6 LITERATURVERZEICHNIS

1. Mehta, RL, Kellum, JA, Shah, SV, Molitoris, BA, Ronco, C, Warnock, DG, Levin, A, the Acute Kidney Injury, N: Acute Kidney Injury Network: report of an initiative to improve outcomes in acute kidney injury. *Critical Care*, 11: R31-R31, 2007.
2. Khwaja, A: KDIGO clinical practice guidelines for acute kidney injury. *Nephron Clin Pract*, 120: c179-184, 2012.
3. Levey, AS, Eckardt, KU, Tsukamoto, Y, Levin, A, Coresh, J, Rossert, J, De Zeeuw, D, Hostetter, TH, Lameire, N, Eknoyan, G: Definition and classification of chronic kidney disease: a position statement from Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO). *Kidney Int*, 67: 2089-2100, 2005.
4. Chapter 1: Definition and classification of CKD. *Kidney International Supplements*, 3: 19-62, 2013.
5. Basile, DP, Anderson, MD, Sutton, TA: Pathophysiology of acute kidney injury. *Compr Physiol*, 2: 1303-1353, 2012.
6. Hsu, Cy, McCulloch, CE, Fan, D, Ordoñez, JD, Chertow, GM, Go, AS: Community-based incidence of acute renal failure. *Kidney international*, 72: 208-212, 2007.
7. Nash, K, Hafeez, A, Hou, S: Hospital-acquired renal insufficiency. *Am J Kidney Dis*, 39: 930-936, 2002.
8. Siew, ED, Davenport, A: The growth of acute kidney injury: a rising tide or just closer attention to detail? *Kidney International*, 87: 46-61, 2015.
9. O'Connor, ME, Kirwan, CJ, Pearse, RM, Prowle, JR: Incidence and associations of acute kidney injury after major abdominal surgery. *Intensive Care Med*, 42: 521-530, 2016.
10. Grant, SW, Grayson, AD, Grant, MJ, Purkayastha, D, McCollum, CN: What are the risk factors for renal failure following open elective abdominal aortic aneurysm repair? *Eur J Vasc Endovasc Surg*, 43: 182-187, 2012.
11. Wahlberg, E, DiMuzio, PJ, Stoney, RJ: Aortic clamping during elective operations for infrarenal disease: The influence of clamping time on renal function. *Journal of Vascular Surgery*, 36: 13-18, 2002.
12. Hill, NR, Fatoba, ST, Oke, JL, Hirst, JA, O'Callaghan, CA, Lasserson, DS, Hobbs, FD: Global Prevalence of Chronic Kidney Disease - A Systematic Review and Meta-Analysis. *PLoS One*, 11: e0158765, 2016.
13. Taal, MW: Chronic kidney disease: towards a risk-based approach. *Clinical medicine (London, England)*, 16: s117-s120, 2016.
14. Go, AS: Cardiovascular Disease Consequences of CKD. *Seminars in Nephrology*, 36: 293-304, 2016.
15. Gorodetskaya, I, Zenios, S, McCulloch, CE, Bostrom, A, Hsu, CY, Bindman, AB, Go, AS, Chertow, GM: Health-related quality of life and estimates of utility in chronic kidney disease. *Kidney Int*, 68: 2801-2808, 2005.
16. Pagels, AA, Soderkvist, BK, Medin, C, Hylander, B, Heiwe, S: Health-related quality of life in different stages of chronic kidney disease and at initiation of dialysis treatment. *Health Qual Life Outcomes*, 10: 71, 2012.
17. Wang, V, Vilme, H, Maciejewski, ML, Boulware, LE: The Economic Burden of Chronic Kidney Disease and End-Stage Renal Disease. *Seminars in Nephrology*, 36: 319-330, 2016.
18. Kerr, M, Bray, B, Medcalf, J, O'Donoghue, DJ, Matthews, B: Estimating the financial cost of chronic kidney disease to the NHS in England. *Nephrol Dial Transplant*, 27 Suppl 3: iii73-80, 2012.

19. Mesropian, PD, Othersen, J, Mason, D, Wang, J, Asif, A, Mathew, RO: Community-acquired acute kidney injury: A challenge and opportunity for primary care in kidney health. *Nephrology (Carlton)*, 21: 729-735, 2016.
20. Warnock, DG, Powell, TC, Donnelly, JP, Wang, HE: Categories of Hospital-Associated Acute Kidney Injury: Time Course of Changes in Serum Creatinine Values. *Nephron*, 131: 227-236, 2015.
21. Susantitaphong, P, Cruz, DN, Cerda, J, Abulfaraj, M, Alqahtani, F, Koulouridis, I, Jaber, BL, Acute Kidney Injury Advisory Group of the American Society of, N: World incidence of AKI: a meta-analysis. *Clin J Am Soc Nephrol*, 8: 1482-1493, 2013.
22. Heung, M, Steffick, DE, Zivin, K, Gillespie, BW, Banerjee, T, Hsu, C-y, Powe, NR, Pavkov, ME, Williams, DE, Saran, R, Shahinian, VB: Acute Kidney Injury Recovery Pattern and Subsequent Risk of CKD: An Analysis of Veterans Health Administration Data. *American Journal of Kidney Diseases*, 67: 742-752, 2016.
23. Varrier, M, Forni, LG, Ostermann, M: Long-term sequelae from acute kidney injury: potential mechanisms for the observed poor renal outcomes. *Crit Care*, 19: 102, 2015.
24. Chawla, LS, Eggers, PW, Star, RA, Kimmel, PL: Acute kidney injury and chronic kidney disease as interconnected syndromes. *N Engl J Med*, 371: 58-66, 2014.
25. Coca, SG, Yusuf, B, Shlipak, MG, Garg, AX, Parikh, CR: Long-term risk of mortality and other adverse outcomes after acute kidney injury: a systematic review and meta-analysis. *Am J Kidney Dis*, 53: 961-973, 2009.
26. Basile, DP, Bonventre, JV, Mehta, R, Nangaku, M, Unwin, R, Rosner, MH, Kellum, JA, Ronco, C, Group, AXW: Progression after AKI: Understanding Maladaptive Repair Processes to Predict and Identify Therapeutic Treatments. *J Am Soc Nephrol*, 27: 687-697, 2016.
27. Sawhney, S, Fraser, SD: Epidemiology of AKI: Utilizing Large Databases to Determine the Burden of AKI. *Adv Chronic Kidney Dis*, 24: 194-204, 2017.
28. Heung, M, Chawla, LS: Acute Kidney Injury: Gateway to Chronic Kidney Disease. *Nephron Clinical Practice*, 127: 30-34, 2014.
29. Vanmassenhove, J, Veys, N, Van Biesen, W: Prevention and conservative management of acute kidney injury. *Minerva urologica e nefrologica = The Italian journal of urology and nephrology*, 68: 58-71, 2016.
30. Mir, MC, Pavan, N, Parekh, DJ: Current Paradigm for Ischemia in Kidney Surgery. *J Urol*, 195: 1655-1663, 2016.
31. Simmons, MN, Lieser, GC, Fergany, AF, Kaouk, J, Campbell, SC: Association between warm ischemia time and renal parenchymal atrophy after partial nephrectomy. *J Urol*, 189: 1638-1642, 2013.
32. Lauschke, A, Teichgraber, UK, Frei, U, Eckardt, KU: 'Low-dose' dopamine worsens renal perfusion in patients with acute renal failure. *Kidney Int*, 69: 1669-1674, 2006.
33. Bellomo, R, Chapman, M, Finfer, S, Hickling, K, Myburgh, J: Low-dose dopamine in patients with early renal dysfunction: a placebo-controlled randomised trial. Australian and New Zealand Intensive Care Society (ANZICS) Clinical Trials Group. *Lancet (London, England)*, 356: 2139-2143, 2000.
34. Denton, MD, Chertow, GM, Brady, HR: "Renal-dose" dopamine for the treatment of acute renal failure: Scientific rationale, experimental studies and clinical trials. *Kidney International*, 50: 4-14, 1996.
35. Kellum, JA, J, MD: Use of dopamine in acute renal failure: a meta-analysis. *Critical care medicine*, 29: 1526-1531, 2001.

36. Mahesh, B, Yim, B, Robson, D, Pillai, R, Ratnatunga, C, Pigott, D: Does furosemide prevent renal dysfunction in high-risk cardiac surgical patients? Results of a double-blinded prospective randomised trial. *Eur J Cardiothorac Surg*, 33: 370-376, 2008.
37. Mehta, RL, Pascual, MT, Soroko, S, Chertow, GM: Diuretics, mortality, and nonrecovery of renal function in acute renal failure. *Jama*, 288: 2547-2553, 2002.
38. Uchino, S, Doig, GS, Bellomo, R, Morimatsu, H, Morgera, S, Schetz, M, Tan, I, Bouman, C, Nacedo, E, Gibney, N, Tolwani, A, Ronco, C, Kellum, JA: Diuretics and mortality in acute renal failure. *Critical care medicine*, 32: 1669-1677, 2004.
39. Grams, ME, Estrella, MM, Coresh, J, Brower, RG, Liu, KD: Fluid Balance, Diuretic Use, and Mortality in Acute Kidney Injury. *Clin J Am Soc Nephrol*, 6: 966-973, 2011.
40. Ejaz, AA, Mohandas, R: Are diuretics harmful in the management of acute kidney injury? *Current opinion in nephrology and hypertension*, 23: 155-160, 2014.
41. Ho, KM, Sheridan, DJ: Meta-analysis of frusemide to prevent or treat acute renal failure. *BMJ*, 333: 420, 2006.
42. Yang, B, Xu, J, Xu, F, Zou, Z, Ye, C, Mei, C, Mao, Z: Intravascular administration of mannitol for acute kidney injury prevention: a systematic review and meta-analysis. *PLoS One*, 9: e85029, 2014.
43. Solomon, R, Werner, C, Mann, D, D'Elia, J, Silva, P: Effects of Saline, Mannitol, and Furosemide on Acute Decreases in Renal Function Induced by Radiocontrast Agents. *New England Journal of Medicine*, 331: 1416-1420, 1994.
44. Hersey, P, Poullis, M: Does the administration of mannitol prevent renal failure in open abdominal aortic aneurysm surgery? *Interact Cardiovasc Thorac Surg*, 7: 906-909, 2008.
45. Bragadottir, G, Redfors, B, Ricksten, SE: Mannitol increases renal blood flow and maintains filtration fraction and oxygenation in postoperative acute kidney injury: a prospective interventional study. *Crit Care*, 16: R159, 2012.
46. Barkhordari, K, Karimi, A, Shafiee, A, Soltaninia, H, Khatami, MR, Abbasi, K, Yousefshahi, F, Haghghat, B, Brown, V: Effect of pentoxifylline on preventing acute kidney injury after cardiac surgery by measuring urinary neutrophil gelatinase - associated lipocalin. *Journal of Cardiothoracic Surgery*, 6: 8, 2011.
47. Dai, B, Liu, Y, Fu, L, Li, Y, Zhang, J, Mei, C: Effect of Theophylline on Prevention of Contrast-Induced Acute Kidney Injury: A Meta-analysis of Randomized Controlled Trials. *American Journal of Kidney Diseases*, 60: 360-370, 2012.
48. Attal, M, Huguet, F, Rubie, H, Charlet, JP, Schlaifer, D, Huynh, A, Laurent, G, Pris, J: Prevention of regimen-related toxicities after bone marrow transplantation by pentoxifylline: a prospective, randomized trial. *Blood*, 82: 732-736, 1993.
49. Acker, CG, Singh, AR, Flick, RP, Bernardini, J, Greenberg, A, Johnson, JP: A trial of thyroxine in acute renal failure. *Kidney Int*, 57: 293-298, 2000.
50. Nigwekar, SU, Strippoli, GF, Navaneethan, SD: Thyroid hormones for acute kidney injury. *The Cochrane database of systematic reviews*: Cd006740, 2013.
51. Voors, AA, Dittrich, HC, Massie, BM, DeLucca, P, Mansoor, GA, Metra, M, Cotter, G, Weatherley, BD, Ponikowski, P, Teerlink, JR, Cleland, JGF, O'Connor, CM, Givertz, MM: Effects of the Adenosine A1 Receptor Antagonist Rolofylline on Renal Function in Patients With Acute Heart Failure and Renal Dysfunction: Results From PROTECT (Placebo-Controlled Randomized Study of the Selective A1 Adenosine Receptor Antagonist Rolofylline for Patients Hospitalized With Acute Decompensated Heart Failure and Volume Overload

- to Assess Treatment Effect on Congestion and Renal Function). *Journal of the American College of Cardiology*, 57: 1899-1907, 2011.
52. Fayad, AI, Buamscha, DG, Ciapponi, A: Intensity of continuous renal replacement therapy for acute kidney injury. *The Cochrane database of systematic reviews*, 10: Cd010613, 2016.
53. Rabindranath, K, Adams, J, Macleod, AM, Muirhead, N: Intermittent versus continuous renal replacement therapy for acute renal failure in adults. *The Cochrane database of systematic reviews*: Cd003773, 2007.
54. Schneider, AG, Bagshaw, SM: Effects of renal replacement therapy on renal recovery after acute kidney injury. *Nephron Clin Pract*, 127: 35-41, 2014.
55. Bhatt, GC, Das, RR: Early versus late initiation of renal replacement therapy in patients with acute kidney injury-a systematic review & meta-analysis of randomized controlled trials. *BMC Nephrol*, 18: 78, 2017.
56. Singh, AP, Junemann, A, Muthuraman, A, Jaggi, AS, Singh, N, Grover, K, Dhawan, R: Animal models of acute renal failure. *Pharmacological reports : PR*, 64: 31-44, 2012.
57. Becker, GJ, Hewitson, TD: Animal models of chronic kidney disease: useful but not perfect. *Nephrol Dial Transplant*, 28: 2432-2438, 2013.
58. Sancak, EB, Tan, YZ, Turkon, H, Silan, C: Attenuation of partial unilateral ureteral obstruction - induced renal damage with hyperbaric oxygen therapy in a rat model. *International braz j urol : official journal of the Brazilian Society of Urology*, 43, 2017.
59. Bae, K-H, Seo, JB, Jung, Y-A, Seo, H-Y, Kang, SH, Jeon, H-J, Lee, JM, Lee, S, Kim, J-G, Lee, I-K, Jung, G-S, Park, K-G: Lobeglitazone, a Novel Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ Agonist, Attenuates Renal Fibrosis Caused by Unilateral Ureteral Obstruction in Mice. *Endocrinol Metab*, 32: 115-123, 2017.
60. Meier, M, Menne, J, Park, JK, Holtz, M, Gueler, F, Kirsch, T, Schiffer, M, Mengel, M, Lindschau, C, Leitges, M, Haller, H: Deletion of protein kinase C-epsilon signaling pathway induces glomerulosclerosis and tubulointerstitial fibrosis in vivo. *J Am Soc Nephrol*, 18: 1190-1198, 2007.
61. Ajith, TA, Abhishek, G, Roshny, D, Sudheesh, NP: Co-supplementation of single and multi doses of vitamins C and E ameliorates cisplatin-induced acute renal failure in mice. *Exp Toxicol Pathol*, 61: 565-571, 2009.
62. Atasayar, S, Güreer-Orhan, H, Orhan, H, Gürel, B, Girgin, G, Özgüneş, H: Preventive effect of aminoguanidine compared to vitamin E and C on cisplatin-induced nephrotoxicity in rats. *Experimental and Toxicologic Pathology*, 61: 23-32, 2009.
63. Ajith, TA, Nivitha, V, Usha, S: Zingiber officinale Roscoe alone and in combination with alpha-tocopherol protect the kidney against cisplatin-induced acute renal failure. *Food Chem Toxicol*, 45: 921-927, 2007.
64. Kadkhodae, M, Khastar, H, Faghihi, M, Ghaznavi, R, Zahmatkesh, M: Effects of co-supplementation of vitamins E and C on gentamicin-induced nephrotoxicity in rat. *Exp Physiol*, 90: 571-576, 2005.
65. Katary, M, Salahuddin, A: Ameliorative effect of gossypin against gentamicin-induced nephrotoxicity in rats. *Life Sci*, 2017.
66. Teslariu, O, Pasca, AS, Mititelu-Tartau, L, Schiriac, CE, Gales, C, Saftencu, PM, Nechifor, M: The protective effects of zinc in experimental gentamicin induced acute renal failure in rats. *Journal of physiology and pharmacology : an official journal of the Polish Physiological Society*, 67: 751-757, 2016.

67. Wei, Q, Wang, MH, Dong, Z: Differential gender differences in ischemic and nephrotoxic acute renal failure. *American journal of nephrology*, 25: 491-499, 2005.
68. Iran-Nejad, A, Nematbakhsh, M, Eshraghi-Jazi, F, Talebi, A: Preventive role of estradiol on kidney injury induced by renal ischemia-reperfusion in male and female rats. *Int J Prev Med*, 6: 22, 2015.
69. Kelly, KJ, Williams, WW, Colvin, RB, Bonventre, JV: Antibody to intercellular adhesion molecule 1 protects the kidney against ischemic injury. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 91: 812-816, 1994.
70. Nakajima, T, Miyaji, T, Kato, A, Ikegaya, N, Yamamoto, T, Hishida, A: Uninephrectomy reduces apoptotic cell death and enhances renal tubular cell regeneration in ischemic ARF in rats. *American Journal of Physiology - Renal Physiology*, 271: F846-F853, 1996.
71. Basile, DP, Martin, DR, Hammerman, MR: Extracellular matrix-related genes in kidney after ischemic injury: potential role for TGF-beta in repair. *The American journal of physiology*, 275: F894-903, 1998.
72. Cruzado, JM, Torras, J, Riera, M, Herrero, I, Hueso, M, Espinosa, L, Condom, E, Lloberas, N, Bover, J, Alsina, J, Grinyo, JM: Influence of nephron mass in development of chronic renal failure after prolonged warm renal ischemia. *Am J Physiol Renal Physiol*, 279: F259-269, 2000.
73. Forbes, JM, Hewitson, TD, Becker, GJ, Jones, CL: Ischemic acute renal failure: long-term histology of cell and matrix changes in the rat. *Kidney Int*, 57: 2375-2385, 2000.
74. Basile, DP, Donohoe, D, Roethe, K, Osborn, JL: Renal ischemic injury results in permanent damage to peritubular capillaries and influences long-term function. *Am J Physiol Renal Physiol*, 281: F887-899, 2001.
75. Kato, A, Hishida, A: Amelioration of post-ischaemic renal injury by contralateral uninephrectomy: a role of endothelin-1. *Nephrol Dial Transplant*, 16: 1570-1576, 2001.
76. Ysebaert, DK, De Greef, KE, Vercauteren, SR, Verhulst, A, Kockx, M, Verpooten, GA, De Broe, ME: Effect of immunosuppression on damage, leukocyte infiltration, and regeneration after severe warm ischemia/reperfusion renal injury. *Kidney Int*, 64: 864-873, 2003.
77. Gueler, F, Gwinner, W, Schwarz, A, Haller, H: Long-term effects of acute ischemia and reperfusion injury. *Kidney Int*, 66: 523-527, 2004.
78. Delbridge, MS, Shrestha, BM, Raftery, AT, El Nahas, AM, Haylor, J: FTY720 reduces extracellular matrix expansion associated with ischemia-reperfusion induced injury. *Transplant Proc*, 39: 2992-2996, 2007.
79. Horbelt, M, Lee, SY, Mang, HE, Knipe, NL, Sado, Y, Kribben, A, Sutton, TA: Acute and chronic microvascular alterations in a mouse model of ischemic acute kidney injury. *Am J Physiol Renal Physiol*, 293: F688-695, 2007.
80. Park, Y, Hirose, R, Dang, K, Xu, F, Behrends, M, Tan, V, Roberts, JP, Niemann, CU: Increased severity of renal ischemia-reperfusion injury with venous clamping compared to arterial clamping in a rat model. *Surgery*, 143: 243-251, 2008.
81. Ascon, M, Ascon, DB, Liu, M, Cheadle, C, Sarkar, C, Racusen, L, Hassoun, HT, Rabb, H: Renal ischemia-reperfusion leads to long term infiltration of activated and effector-memory T lymphocytes. *Kidney Int*, 75: 526-535, 2009.
82. Zager, RA, Johnson, AC, Becker, K: Acute unilateral ischemic renal injury induces progressive renal inflammation, lipid accumulation, histone modification, and

- "end-stage" kidney disease. *Am J Physiol Renal Physiol*, 301: F1334-1345, 2011.
83. Skrypnik, NI, Harris, RC, de Caestecker, MP: Ischemia-reperfusion model of acute kidney injury and post injury fibrosis in mice. *J Vis Exp*, 2013.
84. Holderied, A, Anders, H-J: Animal models of kidney inflammation in translational medicine. *Drug Discovery Today: Disease Models*, 11: 19-27, 2014.
85. Barrera-Chimal, J, Perez-Villalva, R, Ortega, JA, Sanchez, A, Rodriguez-Romo, R, Durand, M, Jaisser, F, Bobadilla, NA: Mild ischemic injury leads to long-term alterations in the kidney: amelioration by spironolactone administration. *Int J Biol Sci*, 11: 892-900, 2015.
86. Gueler, F, Shushakova, N, Mengel, M, Hueper, K, Chen, R, Liu, X, Park, JK, Haller, H, Wensvoort, G, Rong, S: A novel therapy to attenuate acute kidney injury and ischemic allograft damage after allogenic kidney transplantation in mice. *PLoS One*, 10: e0115709, 2015.
87. Monteiro Carvalho Mori da Cunha, MG, Zia, S, Oliveira Arcolino, F, Carlon, MS, Beckmann, DV, Pippi, NL, Luhers Graca, D, Levtchenko, E, Deprest, J, Toelen, J: Amniotic Fluid Derived Stem Cells with a Renal Progenitor Phenotype Inhibit Interstitial Fibrosis in Renal Ischemia and Reperfusion Injury in Rats. *PLoS One*, 10: e0136145, 2015.
88. Sheashaa, H, Lotfy, A, Elhousseini, F, Aziz, AA, Baiomy, A, Awad, S, Alsayed, A, El-Gilany, AH, Saad, MA, Mahmoud, K, Zahran, F, Salem, DA, Sarhan, A, Ghaffar, HA, Sobh, M: Protective effect of adipose-derived mesenchymal stem cells against acute kidney injury induced by ischemia-reperfusion in Sprague-Dawley rats. *Exp Ther Med*, 11: 1573-1580, 2016.
89. Finn, WF: Enhanced recovery from postischemic acute renal failure. Micropuncture studies in the rat. *Circulation research*, 46: 440-448, 1980.
90. Prigent, A: Monitoring renal function and limitations of renal function tests. *Semin Nucl Med*, 38: 32-46, 2008.
91. Soveri, I, Berg, UB, Bjork, J, Elinder, CG, Grubb, A, Mejare, I, Sterner, G, Back, SE, Group, SGR: Measuring GFR: a systematic review. *Am J Kidney Dis*, 64: 411-424, 2014.
92. Uslu, A, Hur, E, Sen, C, Sen, S, Akgun, A, Tasli, FA, Nart, A, Yilmaz, M, Toz, H: To what extent estimated or measured GFR could predict subclinical graft fibrosis: a comparative prospective study with protocol biopsies. *Transpl Int*, 28: 575-581, 2015.
93. Delanaye, P, Souvignet, M, Dubourg, L, Thibaudin, L, Maillard, N, Krzesinski, JM, Cavalier, E, Mariat, C: [Measurement of inulin: development]. *Ann Biol Clin (Paris)*, 69: 273-284, 2011.
94. Pill, J, Issaeva, O, Woderer, S, Sadick, M, Kranzlin, B, Fiedler, F, Klotzer, HM, Kramer, U, Gretz, N: Pharmacological profile and toxicity of fluorescein-labelled sinistrin, a novel marker for GFR measurements. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology*, 373: 204-211, 2006.
95. Ruiz, R, Cordova, MA, Sierra, M, Escanero, JF, Borque, L: Automated Sinistrin Measurement. *Clinical Biochemistry*, 30: 501-504, 1997.
96. Shemesh, O, Golbetz, H, Kriss, JP, Myers, BD: Limitations of creatinine as a filtration marker in glomerulopathic patients. *Kidney International*, 28: 830-838, 1985.
97. Tomlanovich, S, Golbetz, H, Perlroth, M, Stinson, E, Myers, BD: Limitations of Creatinine in Quantifying the Severity of Cyclosporine-Induced Chronic Nephropathy. *American Journal of Kidney Diseases*, 8: 332-337, 1986.

98. MacIsaac, RJ, Ekinci, EI, Premaratne, E, Lu, ZX, Seah, JM, Li, Y, Boston, R, Ward, GM, Jerums, G: The Chronic Kidney Disease-Epidemiology Collaboration (CKD-EPI) equation does not improve the underestimation of Glomerular Filtration Rate (GFR) in people with diabetes and preserved renal function. *BMC Nephrol*, 16: 198, 2015.
99. Ji, M, Lee, YH, Hur, M, Kim, H, Cho, HI, Yang, HS, Navarin, S, Di Somma, S, Network, G: Comparing Results of Five Glomerular Filtration Rate-Estimating Equations in the Korean General Population: MDRD Study, Revised Lund-Malmö, and Three CKD-EPI Equations. *Ann Lab Med*, 36: 521-528, 2016.
100. Delanaye, P, Cavalier, E, Mariat, C, Maillard, N, Krzesinski, JM: MDRD or CKD-EPI study equations for estimating prevalence of stage 3 CKD in epidemiological studies: which difference? Is this difference relevant? *BMC Nephrol*, 11: 8, 2010.
101. Pill, J, Kraenzlin, B, Jander, J, Sattelkau, T, Sadick, M, Kloetzer, HM, Deus, C, Kraemer, U, Gretz, N: Fluorescein-labeled sinistrin as marker of glomerular filtration rate. *Eur J Med Chem*, 40: 1056-1061, 2005.
102. Schock-Kusch, D, Sadick, M, Henninger, N, Kraenzlin, B, Claus, G, Kloetzer, HM, Weiss, C, Pill, J, Gretz, N: Transcutaneous measurement of glomerular filtration rate using FITC-sinistrin in rats. *Nephrol Dial Transplant*, 24: 2997-3001, 2009.
103. Schock-Kusch, D, Xie, Q, Shulhevich, Y, Hesser, J, Stsepankou, D, Sadick, M, Koenig, S, Hoecklin, F, Pill, J, Gretz, N: Transcutaneous assessment of renal function in conscious rats with a device for measuring FITC-sinistrin disappearance curves. *Kidney Int*, 79: 1254-1258, 2011.
104. Herrera Perez, Z, Weinfurter, S, Gretz, N: Transcutaneous Assessment of Renal Function in Conscious Rodents. *J Vis Exp*, 2016.
105. Goldberg, LI: Cardiovascular and renal actions of dopamine: potential clinical applications. *Pharmacological reviews*, 24: 1-29, 1972.
106. McDonald, RH, Goldberg, LI, McNay, JL, Tuttle, EP: Effects of Dopamine in Man: Augmentation of Sodium Excretion, Glomerular Filtration Rate, and Renal Plasma Flow. *Journal of Clinical Investigation*, 43: 1116-1124, 1964.
107. Olsen, NV: Effects of dopamine on renal haemodynamics tubular function and sodium excretion in normal humans. *Danish medical bulletin*, 45: 282-297, 1998.
108. Kindgen-Milles, D, Tarnow, J: [Low dosage dopamine improves kidney function: current status of knowledge and evaluation of a controversial topic]. *Anesthesiologie, Intensivmedizin, Notfallmedizin, Schmerztherapie : AINS*, 32: 333-342, 1997.
109. De Backer, D, Aldecoa, C, Njimi, H, Vincent, JL: Dopamine versus norepinephrine in the treatment of septic shock: a meta-analysis*. *Critical care medicine*, 40: 725-730, 2012.
110. Vasu, TS, Cavallazzi, R, Hirani, A, Kaplan, G, Leiby, B, Marik, PE: Norepinephrine or dopamine for septic shock: systematic review of randomized clinical trials. *J Intensive Care Med*, 27: 172-178, 2012.
111. Marinosci, GZ, De Robertis, E, De Benedictis, G, Piazza, O: Dopamine Use in Intensive Care: Are We Ready to Turn it Down? *Translational medicine @ UniSa*, 4: 90-94, 2012.
112. Schnuelle, P, Lorenz, D, Mueller, A, Trede, M, Van Der Woude, FJ: Donor catecholamine use reduces acute allograft rejection and improves graft survival after cadaveric renal transplantation. *Kidney Int*, 56: 738-746, 1999.

113. Schnuelle, P, Berger, S, de Boer, J, Persijn, G, van der Woude, FJ: Effects of catecholamine application to brain-dead donors on graft survival in solid organ transplantation. *Transplantation*, 72: 455-463, 2001.
114. Schnuelle, P, Gottmann, U, Hoeger, S, Boesebeck, D, Lauchart, W, Weiss, C, Fischereeder, M, Jauch, KW, Heemann, U, Zeier, M, Hugo, C, Pisarski, P, Kramer, BK, Lopau, K, Rahmel, A, Benck, U, Birck, R, Yard, BA: Effects of donor pretreatment with dopamine on graft function after kidney transplantation: a randomized controlled trial. *Jama*, 302: 1067-1075, 2009.
115. Benck, U, Hoeger, S, Brinkkoetter, PT, Gottmann, U, Doenmez, D, Boesebeck, D, Lauchart, W, Gummert, J, Karck, M, Lehmkuhl, HB, Bittner, HB, Zuckermann, A, Wagner, F, Schulz, U, Koch, A, Bigdeli, AK, Bara, C, Hirt, S, Berchtold-Herz, M, Brose, S, Herold, U, Boehm, J, Welp, H, Strecker, T, Doesch, A, Birck, R, Kramer, BK, Yard, BA, Schnuelle, P: Effects of donor pretreatment with dopamine on survival after heart transplantation: a cohort study of heart transplant recipients nested in a randomized controlled multicenter trial. *J Am Coll Cardiol*, 58: 1768-1777, 2011.
116. Losel, RM, Schnetzke, U, Brinkkoetter, PT, Song, H, Beck, G, Schnuelle, P, Hoeger, S, Wehling, M, Yard, BA: N-octanoyl dopamine, a non-hemodynamic dopamine derivative, for cell protection during hypothermic organ preservation. *PLoS One*, 5: e9713, 2010.
117. Vettel, C, Hottenrott, MC, Spindler, R, Benck, U, Schnuelle, P, Tsagogiorgas, C, Kramer, BK, Hoeger, S, El-Armouche, A, Wieland, T, Yard, BA: Dopamine and lipophilic derivatives protect cardiomyocytes against cold preservation injury. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, 348: 77-85, 2014.
118. Le Clef, N, Verhulst, A, D'Haese, PC, Vervaet, BA: Unilateral Renal Ischemia-Reperfusion as a Robust Model for Acute to Chronic Kidney Injury in Mice. *PLoS One*, 11: e0152153, 2016.
119. Klotz, S: Experimentelle Untersuchungen des nephroprotektiven Potenzials von N – Oktanoyl – Dopamin in vivo bei akutem ischämischen Nierenversagen und nach Nierentransplantation. *V Medizinischen Klinik (Nephrologie/Endokrinologie/Rheumatologie) der Medizinischen Fakultät Mannheim der Universität Heidelberg; Institut für Tierpathologie des Fachbereiches Veterinärmedizin der Freien Universität Berlin*. Freie Universität Berlin, 2013.
120. Klotz, S, Pallavi, P, Tsagogiorgas, C, Zimmer, F, Zollner, FG, Binzen, U, Greffrath, W, Treede, RD, Walter, J, Harmsen, MC, Kramer, BK, Hafner, M, Yard, BA, Hoeger, S: N-octanoyl dopamine treatment exerts renoprotective properties in acute kidney injury but not in renal allograft recipients. *Nephrol Dial Transplant*, 31: 564-573, 2016.
121. Fusellier, M, Desfontis, JC, Madec, S, Gautier, F, Debailleul, M, Gogny, M: Influence of three anesthetic protocols on glomerular filtration rate in dogs. *American journal of veterinary research*, 68: 807-811, 2007.
122. Colson, P, Capdevilla, X, Cuchet, D, Saussine, M, Seguin, JR, Marty-Ane, C, Roquefeuil, B: Does choice of the anesthetic influence renal function during infrarenal aortic surgery? *Anesthesia and analgesia*, 74: 481-485, 1992.
123. Schreiber, A, Shulhevich, Y, Geraci, S, Hesser, J, Stsepankou, D, Neudecker, S, Koenig, S, Heinrich, R, Hoecklin, F, Pill, J, Friedemann, J, Schweda, F, Gretz, N, Schock-Kusch, D: Transcutaneous measurement of renal function in conscious mice. *Am J Physiol Renal Physiol*, 303: F783-788, 2012.
124. Racusen, LC, Solez, K, Colvin, RB, Bonsib, SM, Castro, MC, Cavallo, T, Croker, BP, Demetris, AJ, Drachenberg, CB, Fogo, AB, Furness, P, Gaber, LW, Gibson,

- IW, Glotz, D, Goldberg, JC, Grande, J, Halloran, PF, Hansen, HE, Hartley, B, Hayry, PJ, Hill, CM, Hoffman, EO, Hunsicker, LG, Lindblad, AS, Yamaguchi, Y, et al.: The Banff 97 working classification of renal allograft pathology. *Kidney Int*, 55: 713-723, 1999.
125. Rio, DC, Ares, M, Jr., Hannon, GJ, Nilsen, TW: Purification of RNA using TRIzol (TRI reagent). *Cold Spring Harbor protocols*, 2010: pdb.prot5439, 2010.
126. Mühlhardt, C: *Der Experimentator Molekularbiologie Genomics*, Heidelberg, 2013.
127. Schmittgen, TD, Livak, KJ: Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nature protocols*, 3: 1101-1108, 2008.
128. Jaffe, EA, Nachman, RL, Becker, CG, Minick, CR: Culture of Human Endothelial Cells Derived from Umbilical Veins. IDENTIFICATION BY MORPHOLOGIC AND IMMUNOLOGIC CRITERIA. *Journal of Clinical Investigation*, 52: 2745-2756, 1973.
129. Detrisac, CJ, Sens, MA, Garvin, AJ, Spicer, SS, Sens, DA: Tissue culture of human kidney epithelial cells of proximal tubule origin. *Kidney International*, 25: 383-390, 1984.
130. Bouis, D, Hospers, GA, Meijer, C, Molema, G, Mulder, NH: Endothelium in vitro: a review of human vascular endothelial cell lines for blood vessel-related research. *Angiogenesis*, 4: 91-102, 2001.
131. Stamellou, E, Fontana, J, Wedel, J, Ntasis, E, Sticht, C, Becker, A, Pallavi, P, Wolf, K, Kramer, BK, Hafner, M, van Son, WJ, Yard, BA: N-octanoyl dopamine treatment of endothelial cells induces the unfolded protein response and results in hypometabolism and tolerance to hypothermia. *PLoS One*, 9: e99298, 2014.
132. Brandoni, A, Torres, AM: Altered Renal Expression of Relevant Clinical Drug Transporters in Different Models of Acute Uremia in Rats. Role of Urea Levels. *Cell Physiol Biochem*, 36: 907-916, 2015.
133. Zager, RA: Uremia induces proximal tubular cytoresistance and heme oxygenase-1 expression in the absence of acute kidney injury. *Am J Physiol Renal Physiol*, 296: F362-368, 2009.
134. Zager, RA, Johnson, AC, Lund, S: Uremia impacts renal inflammatory cytokine gene expression in the setting of experimental acute kidney injury. *Am J Physiol Renal Physiol*, 297: F961-970, 2009.
135. Balbuena, SM, Henn, J, Crigna, AT, Bieback, K, Porubsky, S, Krämer, B, Yard, B: A comparison of long-term renal outcomes in ischemia-induced acute kidney injury models with or without unilateral nephrectomy at the time of ischemia. *Jahrestagung der deutschen Transplantationsgesellschaft*. Hannover, Transplant international, 2019 pp 46.
136. Delbridge, MS, Shrestha, BM, Raftery, AT, El Nahas, AM, Haylor, JL: The effect of body temperature in a rat model of renal ischemia-reperfusion injury. *Transplant Proc*, 39: 2983-2985, 2007.
137. Hofstetter, C, Flondor, M, Boost, KA, Koehler, P, Bosmann, M, Pfeilschifter, J, Zwissler, B, Muhl, H: A brief exposure to isoflurane (50 s) significantly impacts on plasma cytokine levels in endotoxemic rats. *Int Immunopharmacol*, 5: 1519-1522, 2005.
138. Hofstetter, C, Boost, KA, Flondor, M, Basagan-Mogol, E, Betz, C, Homann, M, Muhl, H, Pfeilschifter, J, Zwissler, B: Anti-inflammatory effects of sevoflurane and mild hypothermia in endotoxemic rats. *Acta Anaesthesiol Scand*, 51: 893-899, 2007.

139. Flondor, M, Hofstetter, C, Boost, KA, Betz, C, Homann, M, Zwissler, B: Isoflurane inhalation after induction of endotoxemia in rats attenuates the systemic cytokine response. *Eur Surg Res*, 40: 1-6, 2008.
140. Fukazawa, K, Lee, HT: Volatile anesthetics and AKI: risks, mechanisms, and a potential therapeutic window. *J Am Soc Nephrol*, 25: 884-892, 2014.
141. Motayagheni, N, Phan, S, Eshraghi, C, Nozari, A, Atala, A: A Review of Anesthetic Effects on Renal Function: Potential Organ Protection. *American journal of nephrology*, 46: 380-389, 2017.
142. Solez, Kim, Axelsen, RA, Benediktsson, H, Burdick, JF, Cohen, AH, Colvin, RB, Croker, BP, Droz, D, Dunnill, MS, Halloran, PF, Häyry, P, Jennette, JC, Keown, PA, Marcussen, N, Mihatsch, MJ, Morozumi, K, Myers, BD, Nast, CC, Olsen, S, Racusen, LC, Ramos, EL, Rosen, S, Sachs, DH, Salomon, DR, Sanfilippo, Fred, Verani, R, von Willebrand, Eeva, Yamaguchi, Y: International standardization of criteria for the histologic diagnosis of renal allograft rejection: The Banff working classification of kidney transplant pathology. *Kidney International*, 44: 411-422, 1993.
143. Bhowmik, DM, Dinda, AK, Mahanta, P, Agarwal, SK: The evolution of the Banff classification schema for diagnosing renal allograft rejection and its implications for clinicians. *Indian Journal of Nephrology*, 20: 2-8, 2010.
144. Haas, M: The Revised (2013) Banff Classification for Antibody-Mediated Rejection of Renal Allografts: Update, Difficulties, and Future Considerations. *Am J Transplant*, 16: 1352-1357, 2016.
145. Haas, M, Sis, B, Racusen, LC, Solez, K, Glotz, D, Colvin, RB, Castro, MC, David, DS, David-Neto, E, Bagnasco, SM, Cendales, LC, Cornell, LD, Demetris, AJ, Drachenberg, CB, Farver, CF, Farris, AB, 3rd, Gibson, IW, Kraus, E, Liapis, H, Loupy, A, Nickeleit, V, Randhawa, P, Rodriguez, ER, Rush, D, Smith, RN, Tan, CD, Wallace, WD, Mengel, M, Banff meeting report writing, c: Banff 2013 meeting report: inclusion of c4d-negative antibody-mediated rejection and antibody-associated arterial lesions. *Am J Transplant*, 14: 272-283, 2014.
146. Farris, AB, Adams, CD, Broussides, N, Della Pelle, PA, Collins, AB, Moradi, E, Smith, RN, Grimm, PC, Colvin, RB: Morphometric and visual evaluation of fibrosis in renal biopsies. *J Am Soc Nephrol*, 22: 176-186, 2011.
147. Abbate, M, Zoja, C, Remuzzi, G: How does proteinuria cause progressive renal damage? *J Am Soc Nephrol*, 17: 2974-2984, 2006.
148. Fogo, AB: Mechanisms of progression of chronic kidney disease. *Pediatr Nephrol*, 22: 2011-2022, 2007.
149. He, J, Xu, Y, Koya, D, Kanasaki, K: Role of the endothelial-to-mesenchymal transition in renal fibrosis of chronic kidney disease. *Clin Exp Nephrol*, 17: 488-497, 2013.
150. Spindler, RS, Schnuelle, P, Nickels, L, Jarczyk, J, Waldherr, R, Theisinger, S, Theisinger, B, Klotz, S, Tsagogiorgas, C, Gottmann, U, Kramer, BK, Yard, BA, Hoeger, S: N-Octanoyl Dopamine for Donor Treatment in a Brain-death Model of Kidney and Heart Transplantation. *Transplantation*, 99: 935-941, 2015.
151. Kadieva, VS, Friedman, L, Margolius, LP, Jackson, SA, Morrell, DF: The effect of dopamine on graft function in patients undergoing renal transplantation. *Anesthesia and analgesia*, 76: 362-365, 1993.
152. Dalton, RS, Webber, JN, Cameron, C, Kessaris, N, Gibbs, PG, Tan, LC, Walters, MA, Sadek, SA, Datta, AK: Physiologic impact of low-dose dopamine on renal function in the early post renal transplant period. *Transplantation*, 79: 1561-1567, 2005.

153. Schnuelle, P, Schmitt, WH, Weiss, C, Habicht, A, Renders, L, Zeier, M, Druschler, F, Heller, K, Pisarski, P, Banas, B, Kramer, BK, Jung, M, Lopau, K, Olbricht, CJ, Weihprecht, H, Schenker, P, De Fijter, JW, Yard, BA, Benck, U: Effects of Dopamine Donor Pretreatment on Graft Survival after Kidney Transplantation: A Randomized Trial. *Clin J Am Soc Nephrol*, 12: 493-501, 2017.
154. Schnuelle, P, Benck, U, Yard, BA: Dopamine in transplantation: Written off or comeback with novel indication? *Clin Transplant*, 32: e13292, 2018.
155. Pallavi, P, Pretze, M, Caballero, J, Li, Y, Hofmann, BB, Stamellou, E, Klotz, S, Wangler, C, Wangler, B, Loesel, R, Roth, S, Theisinger, B, Moerz, H, Binzen, U, Greffrath, W, Treede, RD, Harmsen, MC, Kramer, BK, Hafner, M, Yard, BA, Kalsch, AI: Analyses of Synthetic N-Acyl Dopamine Derivatives Revealing Different Structural Requirements for Their Anti-inflammatory and Transient-Receptor-Potential-Channel-of-the-Vanilloid-Receptor-Subfamily-Subtype-1 (TRPV1)-Activating Properties. *J Med Chem*, 61: 3126-3137, 2018.
156. Yard, B, Beck, G, Schnuelle, P, Braun, C, Schaub, M, Bechtler, M, Gottmann, U, Xiao, Y, Breedijk, A, Wandschneider, S, Losel, R, Sponer, G, Wehling, M, van der Woude, FJ: Prevention of Cold-Preservation Injury of Cultured Endothelial Cells by Catecholamines and Related Compounds. *American Journal of Transplantation*, 4: 22-30, 2004.
157. Berger, SP, Hunger, M, Yard, BA, Schnuelle, P, Van Der Woude, FJ: Dopamine induces the expression of heme oxygenase-1 by human endothelial cells in vitro. *Kidney Int*, 58: 2314-2319, 2000.
158. Tsagogiorgas, C, Wedel, J, Hottenrott, M, Schneider, MO, Binzen, U, Greffrath, W, Treede, RD, Theisinger, B, Theisinger, S, Waldherr, R, Kramer, BK, Thiel, M, Schnuelle, P, Yard, BA, Hoeger, S: N-octanoyl-dopamine is an agonist at the capsaicin receptor TRPV1 and mitigates ischemia-induced [corrected] acute kidney injury in rat. *PLoS One*, 7: e43525, 2012.
159. Ait-Hsiko, L, Kraaij, T, Wedel, J, Theisinger, B, Theisinger, S, Yard, B, Bugert, P, Schedel, A: N-octanoyl-dopamine is a potent inhibitor of platelet function. *Platelets*, 24: 428-434, 2013.
160. Wedel, J, Hottenrott, MC, Stamellou, E, Breedijk, A, Tsagogiorgas, C, Hillebrands, JL, Yard, BA: N-Octanoyl dopamine transiently inhibits T cell proliferation via G1 cell-cycle arrest and inhibition of redox-dependent transcription factors. *J Leukoc Biol*, 96: 453-462, 2014.
161. Jimenez, N, Krouwer, VJ, Post, JA: A new, rapid and reproducible method to obtain high quality endothelium in vitro. *Cytotechnology*, 65: 1-14, 2013.
162. Hunter, CA, Jones, SA: IL-6 as a keystone cytokine in health and disease. *Nat Immunol*, 16: 448-457, 2015.
163. Kenneth Murphy, CW: *Janeway Immunologie*, Berlin, Heidelberg, Springer Spektrum, 2018.
164. Baggiolini M, C-LI: Interleukin-8, a chemotactic and inflammatory cytokine. *FEBS letters*, 307: 97-101, 1992.
165. Kong, DH, Kim, YK, Kim, MR, Jang, JH, Lee, S: Emerging Roles of Vascular Cell Adhesion Molecule-1 (VCAM-1) in Immunological Disorders and Cancer. *Int J Mol Sci*, 19, 2018.
166. Chen, L, Marko, L, Kassmann, M, Zhu, Y, Wu, K, Gollasch, M: Role of TRPV1 channels in ischemia/reperfusion-induced acute kidney injury. *PLoS One*, 9: e109842, 2014.
167. Ueda, K, Tsuji, F, Hirata, T, Takaoka, M, Matsumura, Y: Preventive Effect of TRPV1 Agonists Capsaicin and Resiniferatoxin on Ischemia/Reperfusion-

- induced Renal Injury in Rats. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, 51: 513-520, 2008.
168. Rayamajhi, S, Contractor, T, Wang, DH: The potential of TRPV1 agonists for treating ischemia/reperfusion-induced renal injuries. *Current opinion in investigational drugs (London, England : 2000)*, 10: 963-970, 2009.
169. Ameyar, M, Wisniewska, M, Weitzman, JB: A role for AP-1 in apoptosis: the case for and against. *Biochimie*, 85: 747-752, 2003.
170. Wedel, J: N-OKTANOYL-DOPAMIN ein potentiell neues Immunsuppressivum: in Richtung einer niedrig-dosierten Kalzineurin-Inhibitor-Therapie. *V Medizinische Klinik. Medizinische Fakultät Mannheim der Ruprecht-Karls-Universität zu Heidelberg*, 2013.
171. Van der Hauwaert, C, Savary, G, Gnemmi, V, Glowacki, F, Pottier, N, Bouillez, A, Maboudou, P, Zini, L, Leroy, X, Cauffiez, C, Perrais, M, Aubert, S: Isolation and characterization of a primary proximal tubular epithelial cell model from human kidney by CD10/CD13 double labeling. *PLoS One*, 8: e66750, 2013.
172. Trifillis, AL, Regec, AL, Trump, BF: Isolation, Culture and Characterization of Human Renal Tubular Cells. *The Journal of Urology*, 133: 324-329, 1985.
173. Helbert, MJF, Dauwe, SEH, Van der Biest, I, Nouwen, EJ, De Broe, ME: Immunodissection of the human proximal nephron: Flow sorting of S1S2S3, S1S2 and S3 proximal tubular cells. *Kidney International*, 52: 414-428, 1997.
174. Qi, W, Johnson, DW, Vesey, DA, Pollock, CA, Chen, X: Isolation, propagation and characterization of primary tubule cell culture from human kidney. *Nephrology (Carlton)*, 12: 155-159, 2007.
175. Chatauret, N, Badet, L, Barrou, B, Hauet, T: Ischemia-reperfusion: From cell biology to acute kidney injury. *Progrès en Urologie*, 24: S4-S12, 2014.
176. Nourbakhsh, N, Singh, P: Role of renal oxygenation and mitochondrial function in the pathophysiology of acute kidney injury. *Nephron Clin Pract*, 127: 149-152, 2014.
177. Basile, DP, Yoder, MC: Renal endothelial dysfunction in acute kidney ischemia reperfusion injury. *Cardiovascular & hematological disorders drug targets*, 14: 3-14, 2014.
178. Hosohata, K: Role of Oxidative Stress in Drug-Induced Kidney Injury. *Int J Mol Sci*, 17, 2016.
179. Kelly, KJ, Meehan, SM, Colvin, RB, Williams, WW, Bonventre, JV: Protection from toxicant-mediated renal injury in the rat with anti-CD54 antibody. *Kidney Int*, 56: 922-931, 1999.
180. Ko, GJ, Boo, CS, Jo, SK, Cho, WY, Kim, HK: Macrophages contribute to the development of renal fibrosis following ischaemia/reperfusion-induced acute kidney injury. *Nephrol Dial Transplant*, 23: 842-852, 2008.
181. Kie, J-H, Kapturczak, MH, Traylor, A, Agarwal, A, Hill-Kapturczak, N: Heme Oxygenase-1 Deficiency Promotes Epithelial-Mesenchymal Transition and Renal Fibrosis. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*, 19: 1681-1691, 2008.
182. Nath, KA: Heme oxygenase-1 and acute kidney injury. *Current opinion in nephrology and hypertension*, 23: 17-24, 2014.
183. Si, YN, Bao, HG, Xu, L, Wang, XL, Shen, Y, Wang, JS, Yang, XB: Dexmedetomidine protects against ischemia/reperfusion injury in rat kidney. *European review for medical and pharmacological sciences*, 18: 1843-1851, 2014.

184. Chok, MK, Conti, M, Almolki, A, Ferlicot, S, Loric, S, Durrbach, A, Benoit, G, Droupy, S, Eschwege, P: Renoprotective potency of amifostine in rat renal ischaemia-reperfusion. *Nephrol Dial Transplant*, 25: 3845-3851, 2010.
185. Senbel, AM, AbdelMoneim, L, Omar, AG: Celecoxib modulates nitric oxide and reactive oxygen species in kidney ischemia/reperfusion injury and rat aorta model of hypoxia/reoxygenation. *Vascul Pharmacol*, 62: 24-31, 2014.
186. Kezic, A, Spasojevic, I, Lezaic, V, Bajcetic, M: Mitochondria-Targeted Antioxidants: Future Perspectives in Kidney Ischemia Reperfusion Injury. *Oxid Med Cell Longev*, 2016: 2950503, 2016.
187. Dare, AJ, Bolton, EA, Pettigrew, GJ, Bradley, JA, Saeb-Parsy, K, Murphy, MP: Protection against renal ischemia–reperfusion injury in vivo by the mitochondria targeted antioxidant MitoQ. *Redox Biology*, 5: 163-168, 2015.

7 LEBENS LAUF

PERSONALIEN

Name und Vorname: Henn, Judith Christiane
Geburtsdatum: 13.01.1994
Geburtsort: Freiburg im Breisgau
Familienstand: ledig
Vater: Dr. Johannes Wolfgang Henn
Mutter: Ulrike Kretzler-Henn

SCHULISCHER WERDEGANG

2004 – 2012 Deutsch-Französisches Gymnasium Freiburg
22.06.2012 Abitur (1,0)

UNIVERSITÄRER WERDEGANG

WS 2012/13	Beginn des Studiums (Humanmedizin) an der Universität Heidelberg Fakultät Mannheim.
12/2012 - 11/2018	Stipendiatin der Studienstiftung des deutschen Volkes
15.09. 2014	1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (Note 1,0)
2014 – 2017	Hauptstudium
12.10. 2017	2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (Note 1,0)
14.11. 2018	3. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (Note 1,0)
20.11. 2018	Approbation als Ärztin

8 DANKSAGUNG

Herrn Prof. Yard. danke ich für die Überlassung des Themas dieser Arbeit und die ausgezeichneten Möglichkeiten, es zu bearbeiten.

Besonderen Dank schulde ich Frau Prem und Frau Breedijk-Yard, die mich in die Methoden einarbeiteten und mir bei Problemen stets zur Seite standen.

Ich danke Frau Sylvia Büttner aus der Abteilung für Medizinische Statistik für die Unterstützung bei der Durchführung der statistischen Analysen.

Ganz besonderer Dank gebührt meiner Familie und meinem Freund. Sie unterstützten mich in allen Phasen meiner Promotion, gaben mir in der Diskussion Anregungen und nach der Durchsicht wertvolle Korrekturvorschläge.