

Clara Daschner

Dr. med.

Protektiver Effekt von APG101 beim experimentellen Ischämie-Reperfusionsschaden der Niere über Beeinflussung von Nekroptose und inflammatorischen Prozessen

Fach/Einrichtung: Nephrologie

Doktorvater: Prof. Dr. med. Christian Morath

Einleitung: Der Ischämie-Reperfusionsschaden (I/R) ist eine unvermeidliche Folge der Nierentransplantation und der Hauptgrund für eine verzögerte Funktionsaufnahme des Transplantates. Neuste Erkenntnisse zeigen, dass tubulärer Zelluntergang hierbei nicht ausschließlich durch einfache Nekrose und Apoptose sondern durch einen Mischphänotyp, die Nekroptose, geschieht. Die Nekroptose kann durch verschiedene Todesmechanismen eingeleitet werden. Das Fas-Rezeptor (Fas)/Fas-Liganden (FasL)-System scheint hierbei eine große Rolle zu spielen. APG101 ist ein lösliches humanes Fas-Fc-Fusionsprotein, das sich stark an den FasL bindet und als Folge die Interaktion zwischen dem FasL und dem Fas verhindern kann. Hypothese dieser Arbeit ist es, dass die pharmakologische Inhibition der Bindung von Fas-FasL durch APG101 einen protektiven Effekt auf den I/R hat, indem die Nekroptose verhindert wird.

Material und Methoden: Es wurde ein bereits etabliertes Ischämie-Reperusionsmodell im Mäuseversuch verwendet. APG101 wurde den Tieren einmalig präoperativ intraperitoneal verabreicht. Die Kontrolle der Nierenfunktion erfolgte über die Bestimmung von Serumkreatinin und –harnstoff sowie der Urinexkretion. Histologisch wurden eine quantitative Überprüfung der Tubuluszellen und eine semiquantitative Auswertung der Vitalität der Tubuluszellen durchgeführt, um das Ausmaß des Gewebes Schadens zu erfassen. Zusätzlich wurden die Entzündungsreaktionen, die apoptotischen/nekroptotischen Prozesse und der Zellturnover in der Niere untersucht. Dies geschah semiquantitativ über immunhistologische Färbungen von Fas, Caspase-8 und quantitativ über die Zahl an apoptotischen (TUNEL) und proliferierenden (KI67) Zellen pro Oberfläche. Die Proteinexpressionen von Caspase-3, Fas, RIPK3 und HMGB1 wurden quantitativ durch

Western-Blot erfasst. Mithilfe der PCR wurden die Genexpressionen von Fas, Caspase-8, Noxa, TNF-alpha, IL-6, KI67, McI1 und Bbc3 bestimmt. Die Tiere wurden nach zwei bzw. nach sieben Tagen untersucht, um die Auswirkung von APG101 in der frühen und in der späten Phase des I/R zu analysieren.

Ergebnisse: Sowohl im 2 Tage-Experiment als auch im 7 Tage-Experiment zeigten sich positive Auswirkungen von APG101 auf den I/R der Niere.

2 Tage-Experiment: Zwei Tage nach Reperfusion waren die Effekte von APG101 noch nicht stark ausgeprägt. In der Histologie war der tubuläre Schaden bereits sichtbar, der sich durch Gabe von APG101 leicht verschlechtert darstellte. Eine Verhinderung des signifikanten Anstiegs des Serumharnstofflevels durch das Medikament, der durch den I/R entsteht, spricht für eine verbesserte Nierenfunktion. Diesen protektiven Effekt erzielt APG101 am ehesten über das verstärkte Einsetzen der Apoptose anstelle der Nekroptose. Hierfür sprechen sowohl die histologische Auswertung von TUNEL und Caspase-8, als auch die Genexpression der Modulatoren der Apoptose. Zudem zeigt sich bereits eine Tendenz, dass auch die Inflammation positiv beeinflusst wird.

7 Tage-Experiment: Nach sieben Tagen zeigen sich die protektiven Effekt von APG101 ausgeprägter. Die inflammatorischen Zytokine, die bekannterweise den I/R verschlechtern, waren signifikant reduziert nachweisbar. Makrophagen sind vermindert in der Niere anwesend, was insgesamt für eine vermindert ablaufende Entzündung in den behandelten Tieren spricht. Die Nieren scheinen unter APG101 schneller zu regenerieren. Zudem läuft weniger Zelltod in der späteren Phase ab als in den Kontrolltieren. Die Befürchtung, dass APG101 die Proliferation negativ beeinflusst und somit zu einer schlechteren Erholung führt, konnte nicht bestätigt werden.

Schlussfolgerung: Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, dass APG101 einen protektiven Effekt auf die Nieren beim I/R zu haben scheint. Dies ist v.a. auf eine Reduktion inflammatorischer Prozesse und Beeinflussung des Zelltodes zurückzuführen. Es scheint vermindert Nekroptose abzulaufen. Stattdessen wird der Schaden v.a. durch Apoptose übermittelt, welche schneller beendet ist und auch früher zu einer Regeneration führt. Diese positiven Effekte von APG101 könnte es interessant für den Einsatz am Menschen im Gebiet des I/R machen. Sinnvoll wäre jedoch eine Kombinationstherapie, da APG101 häufig lediglich die signifikanten Veränderungen des I/R verhindern kann, nicht jedoch zu einer vollständigen Normalisierung der Werte führt. Die zusätzliche Gabe des Pancaspaseinhibitors

zVAD wäre eine gute Möglichkeit. Dieser würde die vermehrte Apoptose verhindern, die durch APG101 bei Inhibition der Nekroptose aktiv wird. Dadurch kann möglicherweise noch mehr Schaden besonders in der Anfangszeit verhindert werden.