Universität Ulm
Klinik für Anästhesiologie
Leiter: Prof. Dr. med. Dr. med. h. c. M. Georgieff
Sektion Anästhesiologische Pathophysiologie und Verfahrensentwicklung
Leiter: Prof. Dr. med. Dr. h. c. Peter Radermacher

Einsatz von carbamyliertem Erythropoetin zur Prophylaxe von Ischämie- und Reperfusionschäden der Niere nach Ballonokklusion der Aorta am Schweinemodell

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Universität Ulm

Šárka Matějková
aus Nové Město na Moravě
2013

Amtierender Dekan:	Prof. Dr. Thomas Wirth
1. Berichterstatter:	Prof. Dr. Dr. Peter Radermacher
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. Hubert Schelzig
Tag der Promotion:	11. Juli 2014

Widmung

In Liebe: Vlasta, Magdaléna und Rainer

In Dankbarkeit: Eberhard Bleinroth, Herbert Walter und Peter Radermacher

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis ..... **VI**

1. Einleitung **1**

1.1 Aortenaneurysmen 1

1.2 akute Ischämie der Niere 2

1.3 oxidativer und nitrosativer Stress 3

1.4 Apoptose und Nekrose 4

1.5 Erythropoetin 6

1.6 carbamyliertes Erythropoetin 8

1.7 das Schweinemodell 10

1.8 Fragestellung dieser Arbeit 10

2. Material und Methoden **13**

2.1 Aufbau und Ablauf der Studie 13

2.2 Bestimmungen aus Plasma und Urin 18

2.3 Comet Assay 22

2.4 Western Blot und EMSA 25

2.5 Histologie 27

2.6 Immunhistochemie zur Bestimmung von EPO-R 28

2.7 perioperative Parameter 29

2.8 statistische Auswertung 30

2.9 Reagenzien, Materialien, Geräte 30

3. Ergebnisse **37**

3.1 perioperative Parameter 37

3.2 Nierenfunktion 38

3.3 systemische Stressantwort 42

3.4 Stressantwort der Niere 45

3.5 Apoptose 49

3.6 EPO-Rezeptor 51

3.7 Nierenmorphologie 52

4. Diskussion **69**

4.1 das Studienmodell 69

4.2 Nierenprotektion auf funktioneller Ebene 73

4.3 Modulation einer Entzündungsreaktion 74

4.4 Schutz vor oxidativen und nitrosativen Stress 75

4.5 Modulation einer möglichen Apoptose 77

4.6 Nierenprotektion durch Erhalt der zellulären Integrität 78

4.7 Schlussfolgerungen 80

5. Zusammenfassung **83**

6. Literaturverzeichnis **85**

Abkürzungsverzeichnis

A.: Arterie

ACE-I : angiotensin-converting-enzyme inhibitor

ANV: akutes Nierenversagen

APS: Ammoniumpersulfat

ATP: Adenosintriphosphat

ATPase: Adenosintriphosphatase

Bcl-2: B cell lymphoma 2

Bcl-XL: B cell lymphona extra large

BE: base excess

BF: Blutfluss

BGA: Blutgasanalyse

BSA: bovines Serumalbumin

BZ: Blutzucker

CA: Comet Assay

cEPO: carbamyliertes Erythropoetin

CO: Kohlenstoffmonoxid

COi: cardiac output index

COX-2: Cyclooxygenase 2

cpm: counts per minute

EKG: Elektrokardiogramm

ELISA: Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

EMSA: Electrophoretic Mobility Shift Assay

eNOS: endotheliale Stickstoffmonoxidsynthase

EPO: Erythropoetin

EPO-R: Erythropoetinrezeptor

FBM: familial hypercholesterolaemia Bretoncelles Meishan Schweinezüchtung

Fc: Immunglobulinfragment c

FiO2: inspiratorische Sauerstofffraktion

frakt. NaEx: fraktionelle Natriumexkretion

GFR: glomeruläre Filtrationsrate

Hb: Hämoglobin

HES: Hydroxyethylstärke

HF: Herzfrequenz

HIF-1: Hypoxie-induzierter Faktor 1

HO-1: Hämoxygenase 1

HZV: Herzzeitvolumen

I/R: Ischämie/Reperfusion-Sequenz

IE: internationale Einheiten

IL-1β: Interleukin 1β

iNOS: induzierbare Stickstoffmonoxidsynthase

ITBV: intrathorakales Blutvolumen

IκB: Inhibitor of NFκB

K: Kalium

KG: Körpergewicht

KreaClear: Kreatininclearance

LH-Monovette: Blutentnahmeröhrchen mit Lithiumheparin

LMP-Agarose: low melting point Agarose

M: molar (mol/l)

MAD: mittlerer arterieller Druck

MEEO-Agarose: Medium-Electro-Endoosmosis Agarose

MZP: Messzeitpunkt

N_2: molekularer Stickstoff

Na: Natrium

NFκB: nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells

NGAL: Neutrophilen Gelatinase-assoziiertes Lipocalin

nNOS: neuronale Stickstoffmonoxidsynthase

NO: nitric oxide, Stickstoffmonoxid

NoA: Noradrenalin

PAS: periodic acid Schiff Reaktion (histologische Färbetechnik)

PBS: phosphate buffered saline

pCO2: Kohlendioxidpartialdruck

PEEP: positiver endexspiratorischer Druck

PICCO: Pulse Contour Cardiac Output, Pulskontur-Herzzeitvolumen

pO2: Sauerstoffpartialdruck

rhuEPO: rekombinantes humanes Erythropoetin

RNS: reactive nitrogen species

ROS: reactive oxygen species

rpm: rotations per minute

SDS-PAGE: sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis

SpO2: partielle Sauerstoffsättigung

SV: Schlagvolumen

TBS/T: tris buffered saline + Tween 20

TBS: tris buffered saline

TEMED: Tetramethylethylendiamin

TNFα: Tumornekrosefaktor α

Tween 20: Polysorbat 20, polyoxyethylene (20) sorbitan monolaurate

V.: Vene

XIAP: x-linked inhibitor of apoptosis protein

ZVD: zentraler Venendruck

ZVK: zentraler Venenkatheter

βcR: β common receptor, CD 131

1. Einleitung

Das hier beschriebene Experiment am Schwein der FBM Rasse orientiert sich am klinischen Modell der offenen Operation eines thorakalen Aortenaneurysmas, welche zu einer unumgänglichen Ischämie der distalen Organe, auch der Niere, führt [100, 104, 113]. Eine schwerwiegende Komplikation ist das akute Nierenversagen, welches mit einer erhöhten Mortalität assoziiert ist [82, 86, 112]. Zur Protektion dieses Organs soll carbamyliertes Erythropoetin (cEPO) eingesetzt werden, welches zytoprotektive, nicht-hämatopoetische Eigenschaften besitzt [48, 59, 104]. Die einzelnen Punkte sollen in der Einleitung skizziert werden, wie auch die Stressantwort der Niere nach einer Ischämie/Reperfusionssequenz und die erhoffte Modulation dieser Antwort durch cEPO [3, 16, 61, 97].

1.1 Aortenaneurysmen

Die häufigste Ursache eines Aortenaneurysmas ist die Atherosklerose [72, 87]. Vor allem die arterielle Hypertonie, aber auch Diabetes mellitus und Hypercholesterinämie sind die Risikofaktoren, die zu einer Arteriosklerose führen können. Diese Erkrankungen zeigen in den Industrieländern eine hohe Prävalenz, so dass von einer weiteren Zunahme der Inzidenz von Aortenaneurysmen auszugehen ist [94].

Der Anteil der Aneurysmen im thorakalen Abschnitt beträgt ca. 15 %, der Anteil der Aneurysmen, welche die abdominale Aorta betreffen, liegt bei ca. 85 %. Obwohl etwa 80% aller Aneurysmen asymptomatisch sind und nur zufällig entdeckt werden, müssen die meisten operativ saniert werden, da wiederum 80% unbehandelt an Größe zunehmen und damit das Risiko einer Ruptur und eines letalen Ausgangs steigt. Heutzutage gibt es die Möglichkeit der endoluminalen Aortenstentimplantation, welche eine minimalinvasive Technik darstellt, bei der ein entfaltbarer Stent über die Leistenarterie bis zum Aneurysma vorgeschoben wird. Jedoch sind nur etwa 30% aller Patienten für diesen Eingriff geeignet, die Langzeitergebnisse sind noch abzuwarten. Somit werden immer noch die meisten Patienten mit einem Aortenaneurysma der konventionellen offenen Operation zugeführt. Dabei wird während des Eingriffs unterhalb und oberhalb der Gefäßläsion eine Klemme aufgesetzt und so der Blutfluss durch das betroffene Gefäßsegment vorübergehend unterbrochen. Danach wird der aneurysmatische Gefäßanteil eröffnet, reseziert, durch eine Rohrprothese ersetzt oder über einer Prothese vernäht. Anschließend wird der Blutstrom wieder freigegeben [72, 87].

Die chirurgische Versorgung eines Aortenaneurysmas ist ein klassisches klinisches Beispiel einer Ischämie/Reperfusions-Sequenz, kurz I/R. Die durch eine Abklemmung der Aorta unumgänglichen Ischämie der distalen Organe als auch ein nach Freigabe der Aorta auftretende Reperfusionsschaden können postoperativ zu kardialen und pulmonalen Komplikationen, akuten Nierenversagen, Paraplegie und gastrointestinaler Funktionsstörung führen [10, 113].

Das Risiko einer akuten Nierenschädigung nach einem elektiven Eingriff an der Aorta liegt bei 15 bis 20 % und hängt hauptsächlich vom Alter und einem bereits präoperativ erhöhten Kreatininwert ab. Je höher der präoperative Kreatininwert, desto ungünstiger zeigt sich die postoperative Prognose [34, 89, 113]. Eine postoperative Dialyse wird bei 5 bis 10% aller Fälle notwendig. Die Prognose verschlechtert sich dann dramatisch mit einem Anstieg der Mortalität bis auf 60% [13, 34, 58]. Trotz intensiver Bemühungen konnte die Morbidität und Mortalität durch Substanzen wie Dopamin und seine Analoga, Diuretika, Calciumkanalblocker, ACE Inhibitoren [127], COX-2 Hemmer [42] oder selektive segmentale Arterienperfusion [66] bis heute nicht bedeutend gesenkt werden.

1.2 akute Ischämie der Niere

Mangelperfusion ist die häufigste Ursache einer akuten Nierenschädigung. Das pathologische Korrelat ist eine akute tubuläre Dysfunktion und Nekrose, die sich morphologisch durch Veränderungen und Untergang von Tubulusepithelzellen und klinisch durch eine akute Funktionseinbusse der Niere darstellen [23, 49, 73].

Eine große reabsorptive Kapazität verbunden mit einem hohen Sauerstoffbedarf macht Tubulusepithelzellen besonders vulnerabel gegenüber einer Hyp- oder Anoxie. Störungen der Zellpolarität führen rasch zu einer Umverteilung der basolateralen Natrium/Kalium-ATPasen, resultierend verbleibt mehr Natrium im Lumen. Das wiederum führt zu einem tubuloglomerulären Feedback mit Vasokonstriktion der Vasa afferentes. Die Durchblutung nimmt weiter ab. Zusätzlich verbleibt mehr Natrium im Zytoplasma, es kommt zum Zellödem. Einzelne Epithelzellen lösen sich aus dem Verbund, verbleiben aber durch einen intakten Zell-Zell-Kontakt viabel und akkumulieren in den distalen Tubuli und Sammelrohren. Der intratubuläre Druck kann dadurch ansteigen, was zur Kompression von medullär gelegenen Kapillaren führt, die glomeruläre Filtrationsrate sinkt weiter ab, ein Circulus vitiosus ist entstanden [23]. Regional sind besonders juxtamedulläre und medulläre Nephrone bei einer Hypoxie betroffen [58].

Im histologischen Feinschnitt können charakteristische Veränderungen beobachtet werden:

generalisiertes interstitielles Ödem; Verlust des Bürstensaums, zytoplasmatisches Ödem, Abschilferung, Apoptose und Nekrose vor allem der proximalen Tubuli; granulärer Niederschlag in den distalen Tubuli und Sammelrohren und Dilatation der Tubuluslumina [23, 96].

In der Reperfusionsphase kommt es zu weiterer Zellschädigung durch Azidose, intrazellulären Calciumanstieg, Aktivierung von Leukozyten und Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) durch Granulozyten, derangierte intrazelluläre Enzyme und Mitochondrien. Dies führt zu weiterer zellulärer Dysfunktion und Zelluntergang [58, 96].

Eine ausgeprägte Schädigung mündet letztendlich im akuten Nierenversagen, definiert als ein Anstieg der Retentionswerte (Kreatinin, Harnstoff) im Serum und Abfall der Harnproduktion mit Oligurie bis Anurie innerhalb von wenigen Tagen (d.h. Abfall der glomerulären Filtrationsrate < 10%).

1.3 Oxidativer und nitrosativer Stress

Renale Ischämie als die häufigste Ursache des akuten Nierenversagens stößt komplexe Prozesse auf zellulärer Ebene an, die zur Schädigung und Untergang von Tubulusepithelzellen führen [112]. Zu diesen Prozessen gehören ein erhöhter oxidativer und nitrosativer Stress, Inflammation und Induktion von Apoptose und Nekrose [20, 78]. Nitrosativer und oxidativer Stress sind dabei eng miteinander verknüpft [9].

Reaktive Sauerstoffspezies (ROS) entstehen beständig innerhalb der Zelle und werden durch Radikalfänger wie Dismutasen, Catalasen, Glutathion und antioxidativ wirksame Vitamine unschädlich gemacht. Die wichtigste Quelle von ROS ist das so genannte mitochondriale Leck innerhalb der Atmungskette und die Enzymaktivität von Leukozyten bei der Immunantwort [40]. Wird jedoch das Gleichgewicht zwischen ROS-Bildung und -Abbau gestört, wie dies bei einer Ischämie/Reperfusion-Sequenz der Fall ist, kommt es zum oxidativen Stress der Zelle, in der Niere vor allem der proximalen Tubuluszellen [20]. Es entstehen hochreaktive Radikale in großen Mengen. Diese tragen zur Bildung des weiter unten erwähnten Peroxynitrits bei und schädigen Proteine, Lipide und DNA [68]. Im Rahmen der Lipidperoxidation kommt es unter anderem zur Bildung von Isoprostanen aus dem Membranbaustein Arachidonsäure, darunter auch 8-Isoprostane, einem etablierten Marker für oxidativen Stress [71, 88]. ROS modifizieren Basen und das Zucker-Phosphat-Rückgrat der DNA, es entstehen alkalilabile Stellen, Einzel- und Doppelstrangbrüche. Werden die Reparaturmöglichkeiten der Zelle erschöpft, führen diese Veränderungen zur Apoptose oder Nekrose. In mehreren Studien konnte durch den Einsatz von diversen

Scavengern die Zellschädigung durch ROS abgeschwächt oder verhindert und so die dargestellte Bedeutung bestätigt werden [20, 64, 78].

Stickoxid (NO) spielt eine wichtige Rolle als potenter endogener Vasodilatator, ist aber auch die Quelle für reaktive Stickstoffspezies (RNS). Die Bildung von NO erfolgt durch NO-Synthasen, wovon es drei Isoformen in der Niere gibt: endotheliale, konstitutionell exprimierte Synthase (eNOS), durch Hypoxie induzierbare Synthase (iNOS) und neuronale Synthase (nNOS), welche in der Niere eine untergeordnete Rolle spielt. Eine anhaltend hohe iNOS-Aktivität und eine überschießende NO-Bildung führen zu nitrosativen Stress. In mehreren Arbeiten konnte gezeigt werden, dass die Inhibierung von iNOS einer renalen Schädigung entgegen wirkt [19, 77, 96].

Die zwei schädigende Hauptmechanismen von durch iNOS entstandenem NO sind die Bildung von Peroxynitrit (aus Superoxid und einen Stickoxidradikal) und die Inhibition von eNOS, so dass vasokonstriktiv wirksamen Substanzen nicht adäquat entgegengewirkt werden kann. Dies ist eine wichtige Ursache für das „No-Reflow“ Phänomen, eine konstant reduzierte Durchblutung der Niere nach einer Ischämie/Reperfusion-Sequenz, über das Legrand et al. in ihrer Arbeit ausführlich berichten [58].

Peroxynitrit kann DNA-Strangbrüche induzieren, Lipide zu neuen reaktiven Produkten umwandeln und aromatische Aminosäuren modifizieren, was zu einem Proteinfunktionsverlust führt. Aus der Aminosäure Tyrosin entsteht so Nitrotyrosin [9, 53]. Je höher die Aktivität von iNOS ist, desto mehr NO und Peroxynitrit entsteht, was letztendlich, wenn die Kapazität intrazellulärer Radikalfänger überschritten ist, zu Dysfunktion und Zelltod führt [78].

NO wird im Blut zu Nitrit und weiter zu Nitrat oxidiert, eine erhöhte NO-Freisetzung spiegelt sich somit in entsprechenden Plasmawerten wieder [40].

Als der wichtigste Feedbackmechanismus bei einer hohen iNOS-Aktivität wird das Enzym Hämoxygenase-1 (HO-1) aus der Familie der heat shock Proteine angesehen. HO-1 baut Häm zu Kohlenmonoxid (CO), einem vasodilatierenden und antiinflammatorisch wirksamen Molekül, und Biliverdin, einem potenten Radikalfänger, ab. [37, 96, 119]. Ein hohes Vorkommen von HO-1 kann also als eine adaptive Stressantwort auf nitrosative und oxidative Belastung der Zelle verstanden werden.

1.4 Apoptose und Nekrose

Apoptose ist durch Zellschrumpfung, Chromatinkondensation, intranukleäre DNA-Fragmentierung und Bildung von apoptotischen Körperchen charakterisiert. Diese Form

des Zelluntergangs ist durch viele intrazelluläre Kaskaden kontrolliert und findet sowohl unter physiologischen wie auch unter pathologischen Bedingungen statt. Apoptotische Zellen werden meistens von benachbarten Zellen oder ortständigen Makrophagen rasch aufgenommen und durch neue Zellen oder Zellvergrößerung ersetzt. Beim Ischämie-Reperfusion-Schaden spielt die Apoptose eine bedeutende Rolle. Es werden intrinsische, mitochondriale Kaskaden aktiviert, die wichtigsten Effektoren sind speziellen Proteasen aus der Familie der Caspasen. Caspasen sind Cystein-Proteasen, die bestimmte Proteine irreversibel spalten und so zur Morphologie der Apoptose bedeutend beitragen [112]. Durch zellulären Stress oligomerisierte proapoptotische Proteine aus der Bcl-2 Familie (Bax, Bak, Bad) initiieren eine Abfolge von Veränderungen, die zur Freisetzung von Cytochrom c ins Zytosol und zur Bildung eines Apoptosoms führen. Dieses spaltet die Effektor-Caspase 3, welche kaskadenförmig Caspasen 6 und 7 aktiviert, was letztendlich zur Apoptose führt [11, 17]. Die Apoptose ist jedoch ein fließender Übergang von einem potenziell reversiblen zu einem irreversiblen Vorgang. Dabei hängt es vom Gleichgewicht pro- und antiapoptotisch wirksamer Signale ab, ob eine Apoptose tatsächlich stattfindet. Die Freisetzung von Cytochrom c kann z.B. durch Bcl-2 verhindert werden. Via Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K) wird z.B. Akt zu p-Akt phosphoryliert und kann so Caspase 9, ein Teil des Apoptosoms, Bad (welches Bcl-XL bindet und inaktiviert) und inhibitory factor-κB (IκB) inaktivieren und das Gleichgewicht verschieben. Zu den antiapototischen Molekülen gehören neben Bcl-2 auch Bcl-XL und XIAP, die Effektor-Caspasen inhibieren.

In diesem Zusammenhang soll auch NF-κB, ein nukleärer Transkriptionsfaktor, aufgrund seiner proinflammatorischen und antiapoptotischen Eigenschaften durch Aktivierung bestimmter Zielgene erwähnt werden [93, 110]. Dieser vielseitige Upstream-Regulator spielt natürlich auch abseits der Apotose eine wichtige Rolle: er wird durch Wachstumsfaktoren, Zytokine, bakterielle und virale Antigene und direkte Noxen aktiviert, indem er von IκB freigesetzt wird und reguliert zahlreiche Gene. Dadurch werden unter anderen Antworten des Immunsystems und der Zellzyklus moduliert. Abbildung 1 zeigt nochmals grafisch die beschriebenen Zusammenhänge.

Zu Nekrose kommt es ausschließlich unter pathologischen Bedingungen, wie oxidativer Stress, Hypoxie und Ischämie. Früh kommt es zum Verlust der Zellmembranintegrität, unkontrollierten Leckage von Zytosolbestandteilen, Aktivierung von Zytokinen und folglich einer Entzündung im umliegenden Gewebe.

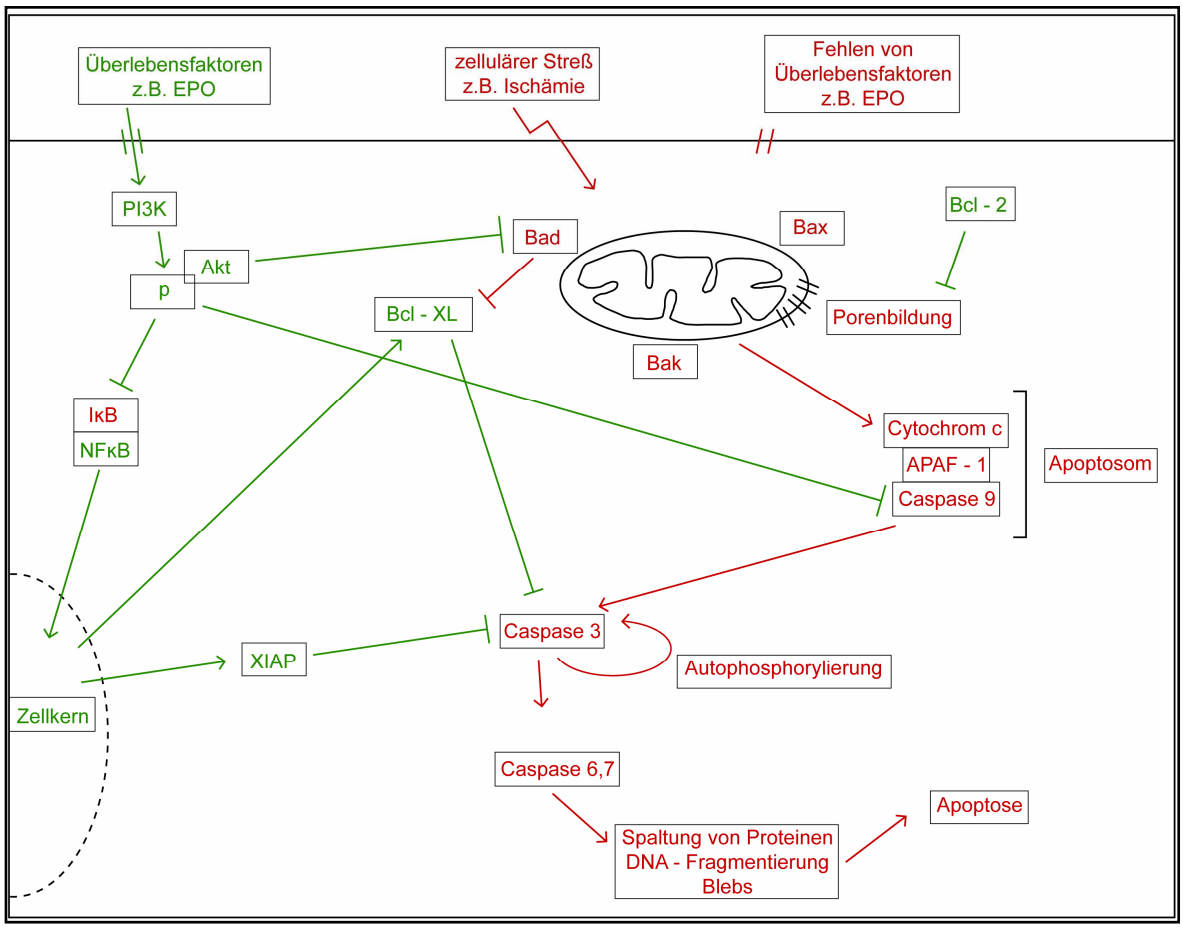

Abb. 1: Ausgewählte, für diese Arbeit relevante Regulation der Apoptose: rot sind proapoptotische, grün antiapoptotische Signalkaskaden dargestellt. Im Wesentlichen führen diverse Überlebensfaktoren über mehrere Schritte zu einer Aktivierung von Bcl-XL und XIAP, was das Gleichgewicht in Richtung Zellerhalt verschiebt. Bleiben diese Signale aus oder kommt es zu einem erhöhten zellulären Stress, werden über mehrere Signalkaskaden Caspasen aktiviert, was letztendlich zur Apoptose führt.
Grafik erstellt von magmadesign, 2011

1.5 Erythropoetin

Zellen sind auf eine kontinuierliche Stimulation durch Überlebensfaktoren angewiesen, um nicht in Apoptose zu übergehen. Zu diesen Faktoren gehört auch das Erythropoetin (EPO). EPO ist seit Jahrzehnten als ein Regulator der Erythropoese bekannt, es wird hauptsächlich in der adulten Niere produziert und steht unter sauerstoffabhängigen, durch Hypoxie induzierbaren regulatorischen Faktoren, wie hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1). Auch andere Stressoren wie ROS, Calciumanstieg und Zytokine wie IL-1β und TNF-α führen zum Anstieg der EPO-Konzentration [61]. Rekombinantes humanes EPO (rhuEPO) wird seit etwa zwanzig Jahren in der Therapie der renalen Anämie bei chronischer

Niereninsuffizienz und tumorassoziierten Anämie verwendet.

EPO war und ist Gegenstand vielfacher Untersuchungen der letzten Jahre, und seine Expression wurde inzwischen auch in extrarenalen Zellen nachgewiesen, u.a. Astrozyten, Neuronen und reproduktiven Organen. Auch der EPO-Rezeptor (EPO-R) wurde auf nicht-erythroiden Zellen gefunden, u.a. Gehirn, Retina, Herz, glatte Muskelzellen und Gefäßendothel [5]. Jenseits der bekannten erythropoetischen Eigenschaften zeigt EPO noch andere Effekte, nämlich eine antiapoptotische, antioxidative, immunmodulatorische und zytoprotektive Wirkung [3, 38, 61].

Die hämatopoetische Wirkung von EPO wird über einen Erythropoetin-Rezeptor-Homodimer vermittelt, wohingegen die nicht-hämatopoetischen Effekte über einen Erythropoetin-Rezeptor-Heterodimer, bestehend aus einem EPO-R Monomer und einer β common Rezeptor Untereinheit (βcR, CD131), getriggert werden [3, 22, 101]. Abbildung 2 zeigt die potenziellen Mechanismen.

In mehreren experimentellen Studien konnte die Wirksamkeit von EPO bei neuronaler, kardialer und renaler Schädigung belegt werden [3, 8, 32, 61]. Bereits durch eine Einzelgabe von nur 300 IU/kg EPO konnte glomeruläre Dysfunktion und tubuläre Schädigung einer Rattenniere nach Ischämie und Reperfusion reduziert werden [97]. Das therapeutische Fenster scheint darüber hinaus sehr groß zu sein. Wie Patel und seine Kollegen berichten, war eine positive Wirkung von EPO in einer Mausniere nach einer Ischämie/Reperfusionssequenz immer noch nachweisbar, obwohl die EPO-Gabe bis zu drei Tage vor der induzierten Ischämie erfolgte. Die Autoren konnten aber auch bei einer EPO-Gabe erst während der Reperfusionsphase noch positive Effekte auf funktioneller, immunmodulatorischer und histologischer Ebene beobachten [85].

Im klinischen Alltag konnten die positiven Ergebnisse aus Tierversuchen jedoch nicht durchgehend bestätigt werden. Im Gegenteil stieg die Mortalität von Patienten nach ischämischen cerebralen Apoplex bei gleichzeitiger Lysetherapie und Gabe von EPO sogar an [33], auch bei Patienten nach Myokardinfarkt wurden Bedenken bezüglich der Sicherheit von EPO geäußert [74]. Die Mechanismen hinter den unerwünschten Wirkungen sind noch nicht hinreichend geklärt, es wurden jedoch dosisabhängige Wirkungen auf das Gefäßendothel mit Aktivierung von Thrombozyten und prothrombogenen Zytokinen postuliert. Diese Wirkungen scheinen vor allem über den EPO-R-Homodimer vermittelt zu werden [1, 22].

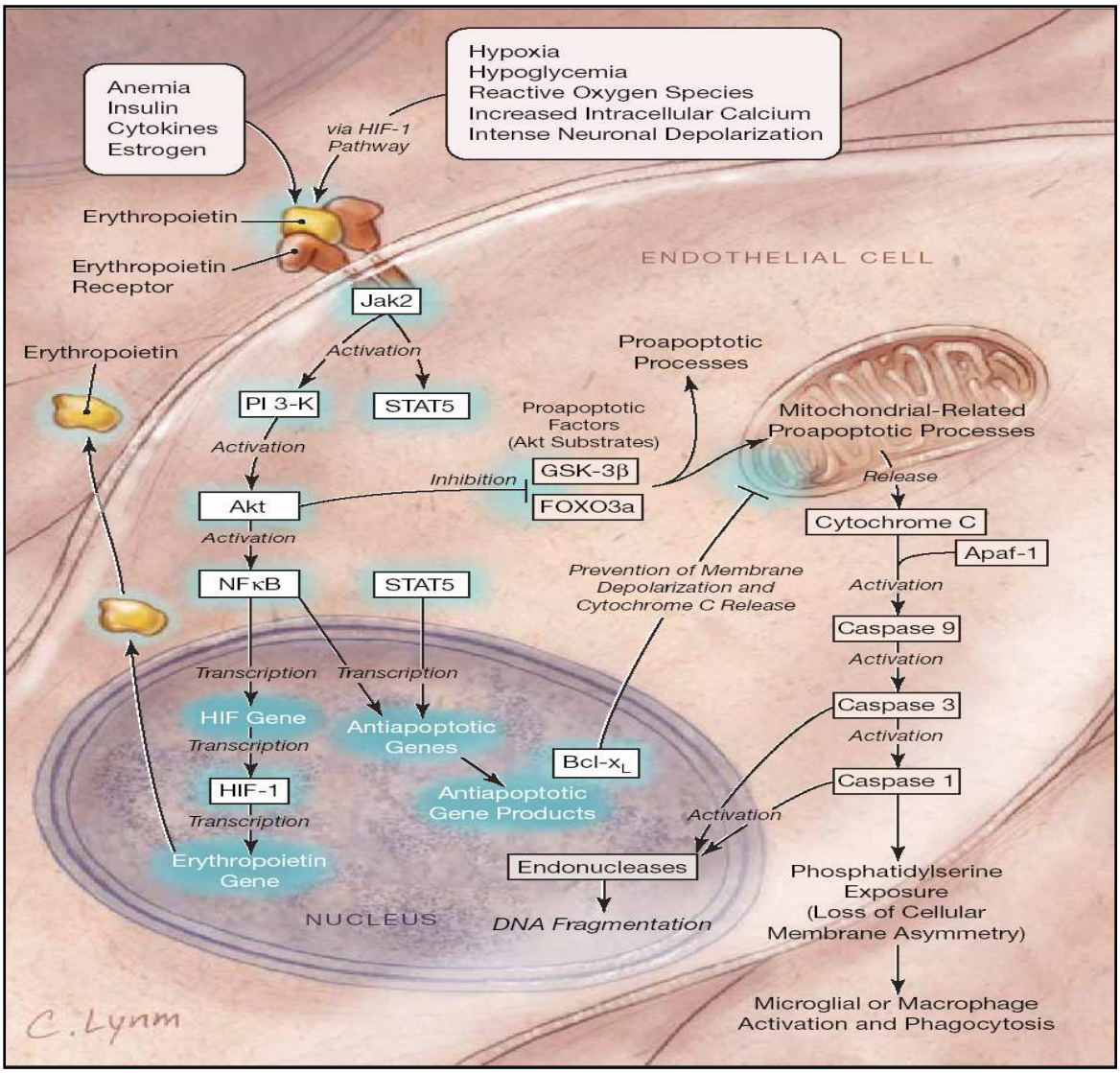

Abb. 2: Mechanismen der Regulation und Zytoprotektion durch EPO: EPO führt über den EPO-R-Heterodimer zu Aktivierung von zellerhaltenden Genen und Bildung von antiapoptotischen Proteinen.
Grafik aus Maiese K, Li F, Chong ZZ: New avenues of exploration for erythropoietin. J Am Med Assoc 293:90-95 (2005)

1.6 carbamyliertes Erythropoetin

Durch eine chemische Modifizierung, die Carbamylierung (d.h. irreversible Transformierung von Lysinresten zu Homocitrullin [50]) von EPO sollen unter Beibehaltung der oben genannten zytoprotektiven Effekte etwaige Komplikationen und Einschränkungen im Einsatz umgangen werden, da cEPO nur über den EPO-βcR Heterodimer agiert [22, 59].

In dieser Arbeit wurde ein Fusionsprotein verwendet (cEPO-Fc), eine Technik der man sich seit den neunziger Jahren bedient. Dabei werden zuerst zwei Moleküle eines rekombinanten Erythropoetins an ihrem N-terminalen Ende an die Fc Domäne eines

humanen Immunglobulins G gekoppelt. Das entstandene Protein wird carbamyliert, so dass von Ausbleiben unerwünschter erythropoetischer Eigenschaften ausgegangen werden kann. Durch die Fusion soll die Serumhalbwertzeit und somit die Aktivität dieses Moleküls verlängert werden, was eine günstigere Pharmakokinetik und die Möglichkeit diverser Darreichungsformen bietet [95]. Vergleichbare neuroprotektiven Effekte von cEPO-Fc und rhEPO konnten bereits in der Arbeit von Simon et al. gezeigt werden [104].
Abbildung 3 zeigt das Fusionsprotein.

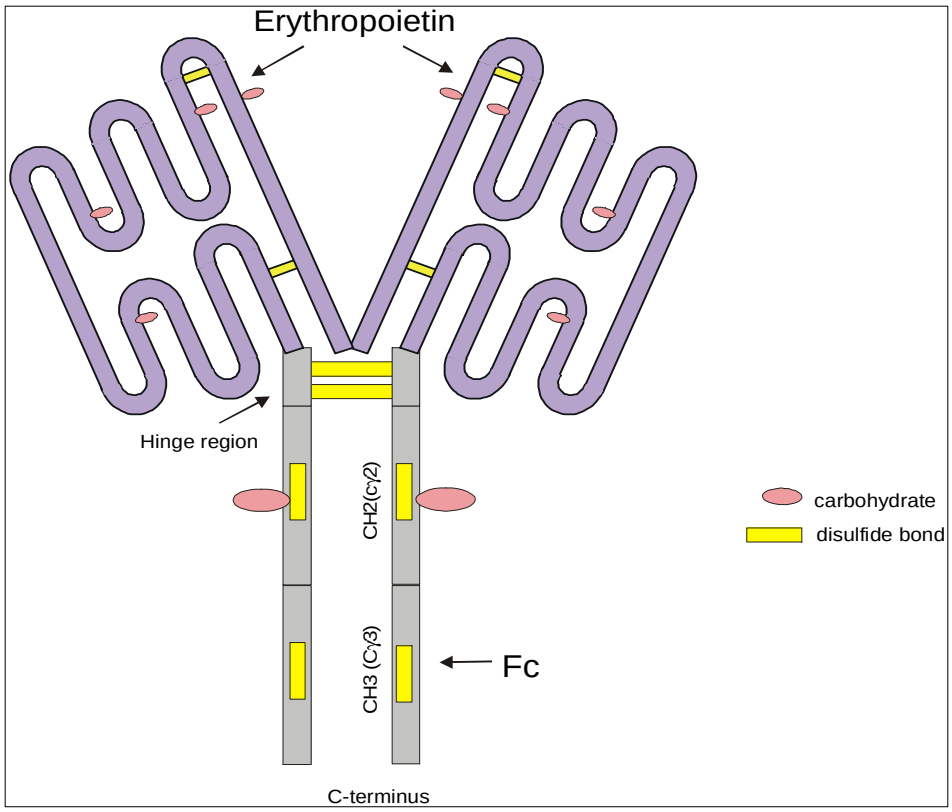

Abb. 3: cEPO-Fusionsprotein, bestehend aus zwei cEPO Molekülen, der Fc Domäne und der Hinge Region eines humanen Immunglobulins G. Die carbamylierten Lysinreste sind nicht dargestellt.
Grafik zur Verfügung gestellt von Polymun Scientific, Wien

Die zytoprotektiven Eigenschaften von cEPO konnten im Tierversuch bereits belegt werden: Neuroprotektion nach ischämischen Apoplex [59], diabetischer Neuropathie, traumatischer Rückenmarksschädigung, und Autoimmunenzephalitis [29]. Modulation der Entzündungsantwort nach Hirntod mit besseren Outcome für die Nierenfunktion nach Transplantation [75]. Verbesserung der Motoneuronenfunktion nach spinaler Ischämie und Reduzierung des oxidativen Stresses [104] und Verbesserung des Outcomes nach Myokardischämie [36, 69].

1.7 Das Schweinemodell

Studien im klinischen Setting sind bis dato nur mit EPO durchgeführt worden. Experimentelle Arbeiten zu EPO und cEPO werden vorwiegend an Mäusen und Ratten durchgeführt, nur wenige an größeren Tieren [2, 18, 62, 98, 104, 105, 106].

Ein Großtiermodell ist dem Nagermodell jedoch überlegen, weil es in seiner Anatomie, Physiologie, Pathophysiologie und Antwort auf Stress eine höhere Analogie zum Menschen aufweist [100].

Die oben aufgeführten Publikationen beschäftigen sich mit jungen, an sich gesunden Landschweinen. In dieser Arbeit wird jedoch auf eine spezielle Schweinezüchtung, die sogenannte FBM Rasse (F = familial hypercholesterolaemia, B = Bretoncelles, M = Meishan) zurückgegriffen. Sie zeichnet sich durch folgende Besonderheiten aus:

- die Kreuzung aus drei Schweinerassen (Rapacz Landschwein, Chinesisches Meishan Minischwein und Minischwein aus Bretoncelles in Frankreich) produziert ein Minischwein, das auch als erwachsenes Tier nicht über 80-90 kg wiegt, was eine gute Handhabung bei Transport und Operation ermöglicht
- die Tiere weisen sich durch einen speziellen Genotyp, eine R84C low density lipoprotein Rezeptormutation, aus, wodurch sie eine Hypercholesterinämie und generalisierte Atherosklerose bereits in jungen Jahren entwickeln
- die Tiere bekommen zusätzlich eine spezielle fett- und cholesterinreiche Diät über 18 Wochen, was die LDL, VLDL und die Atherogenität noch weiter erhöht [114].

Dieses Modell soll so gut wie möglich einen typischen Patienten mit Gefäßsklerose und einem möglichen Aortenaneurysma simulieren und der Klärung der weiter unten aufgeführten Fragen zu Relevanz dieses Modells und der Wirksamkeit von carbamylierten Erythropoetin dienen.

1.8. Fragestellung dieser Arbeit

Elektive offene Eingriffe an der Aorta führen zu einer unumgänglichen Ischämie und Reperfusion der Niere, was in einem akuten Nierenversagen (ANV) münden kann. Bis heute ist es nicht gelungen, die Niere vor diesem Stress effektiv zu schützen. Die Mortalität bei einer notwendigen Dialyse nach einem ANV ist weiterhin hoch.

Der Einsatz von EPO zeigte im Tiermodell jedoch viel versprechende Ergebnisse der Organprotektion, so dass auch klinische Studien initiiert wurden. Metaanalysen offenbarten jedoch auch unerwünschte Effekte, die die Mortalität sogar erhöhen. Durch eine chemische Modifizierung von Erythropoetin zu carbamylierten Erythropoetin sollen diese Effekte

umgangen werden.

Der Einsatz von cEPO an einem Großtiermodell, das einen typischen gefäßchirurgischen Patienten ausreichend simuliert, wurde bis dato nicht unternommen, insbesondere liegen keine Daten zu Auswirkungen auf die Niere unter diesen Bedingungen vor.

In dieser prospektiven randomisierten Studie soll durch eine Ischämie-Reperfusion-Sequenz eine systemische und eine lokale, in der Niere stattfindende, Stressantwort induziert und etwaige Wirksamkeit von cEPO mit Hilfe folgender Parameter untersucht werden:

- Kreatininclearance, fraktionelle Natriumexkretion und NGAL als Nierenfunktionsparameter
- Entzündungsmarker TNFα und IL-6
- 8-Isoprostane als Marker für oxidativen und Nitrat/Nitrit als Marker für nitrosativen Stress
- weiter soll eine DNA Schädigung durch ROS und RNS sowohl im Blut wie auch in der Niere untersucht werden
- mögliche renale Mediatoren wie HIF-1α, iNOS, HO-1 und Nitrotyrosin sollen erfasst werden
- genauso wie die Regulation der Apoptose durch XIAP, Bcl-XL und cleaved Caspase 3
- NF-κB als ein vielseitiger Transkriptionsfaktor und sein zytosolischer Inhibitor IκBa sollten zusätzlich betrachtet werden

Ergänzend zu Funktion und intrazellulären Signalkaskaden soll auch die Nierenmorphologie im histologischen Schnitt untersucht werden. Glomeruläre und tubuläre Veränderungen, die auf eine Derangierung der intrazellulären Selbstregulation und somit Desintegration des Organs durch Apoptose oder Nekrose hindeuten, sollen erfasst werden.

Ergänzend soll noch die EPO-R Expression der FBM Rasse mit der von gesunden deutschen Landschweinen verglichen werden.

Basierend auf den Erkenntnissen über die Wirkungsweise von cEPO bezüglich seiner nichthamätogenen, zytoprotektiven Eigenschaften, sollen mit Hilfe der oben aufgeführten Parameter folgende Fragen geklärt werden:

1. Zeigen die FBM Tiere histomorphologische und funktionelle Veränderungen der Niere wie sie analog bei typischen gefäßchirurgischen Patienten beobachtet werden können?

2. Zeigt cEPO in diesem speziellen atherosklerotischen Großtiermodell eine renoprotektive Wirkung? Wenn ja, welche Mechanismen sind für einen etwaigen Effekt verantwortlich: antiinflammatorische, antiapoptotische oder antioxidative / antinitrosative Aspekte?

2. Material und Methoden

2.1 Aufbau und Ablauf der Studie

2.1.1 Gruppenbildung

Die Versuche wurden im Einklang mit den Deutschen und Europäischen Richtlinien zum Umgang mit Labortieren durchgeführt. Das Versuchsprotokoll wurde vom Tierschutzbeauftragten der Universität Ulm befürwortet und vom Regierungspräsidium Tübingen, Baden-Württemberg, genehmigt.

Für die Versuchsreihe wurden 14 französische 13 bis 20 Monate alten Schweine der FBM Züchtung beiderlei Geschlechts mit einem Körpergewicht von 53 – 85 kg verwendet. Bei der Gruppeneinteilung wurde das Geschlecht der Tiere nicht berücksichtigt, da Erfahrungen aus früheren Arbeiten der Arbeitsgruppen in der Sektion Anästhesiologische Pathophysiologie und Verfahrensentwicklung gezeigt haben, dass die untersuchten Parameter keine geschlechtsspezifischen Unterschiede zeigten [100]. Die Tiere wurden vor dem jeweiligen Versuchstag über 1-2 Wochen im Tierforschungszentrum der Universität Ulm akklimatisiert. Wasser stand den Tieren jederzeit in unbegrenzter Menge zur Verfügung, Nahrungskarenz bestand für 18 Stunden vor Versuchsbeginn.

Die Versuchstiere wurden nummeriert und in zwei Gruppen eingeteilt, ein Los entschied über die Gruppenzugehörigkeit. Eine Gruppe von sieben Tieren bekam eine Natriumchloridlösung nach Schema (Kontrollgruppe), die andere Gruppe von sieben Tieren bekam cEPO-Fc nach Schema (cEPO Gruppe) infundiert. Beide Gruppen durchliefen einen sonst identischen Versuchsablauf.

2.1.2 Anästhesieführung während der Operation

Die Versuchstiere erhielten etwa eine Stunde vor der Narkoseeinleitung im Tierforschungszentrum eine intramuskuläre Sedierung mit 4 mg/kg KG Azaperon, einen speziell für Schweine entwickelten Neuroleptikum mit adrenolytischen Eigenschaften, und 0,05 mg/kg KG Atropin. Anschließend wurden sie in einer Transportbox in den Tieroperationsraum der Sektion Anästhesiologische Pathophysiologie und Verfahrensentwicklung in der Parkstraße 11, 89073 Ulm, gebracht. Hier wurde ein intravenöser Zugang über eine Ohrvene gelegt und es erfolgte eine Präoxygenierung der Tiere. Die Sauerstoffsättigung wurde pulsoxymetrisch mit Hilfe eines Clipsensors am Ohr der Tiere überwacht.

Die Narkose wurde unter Sauerstoffgabe mit 0,25 mg/kg KG Atropin, 1-2 mg/kg KG Ketamin und 2-3 mg/kg KG Propofol intravenös eingeleitet, die Tiere auf dem Rücken

gelagert, orotracheal intubiert und kontrolliert beatmet. Nach der Intubation wurden sie mit einem Bolus von 0,12 mg/kg KG Pancuronium und 20 µg/kg KG Buprenorphin versorgt. Zur Entlastung des Magens wurde eine Magensonde gelegt.

Das Atemzugvolumen betrug 8 ml/kg KG, die inspiratorische O_2-Konzentration (FiO_2) 0,35, die Atemfrequenz 10-12/min und der positive endexspiratorische Druck (PEEP) 10 cmH_2O. Die Beatmung wurde kontinuierlich über die exspiratorische CO_2-Konzentration und die Sauerstoffsättigung (SpO_2) überwacht, intermittierend durch arterielle Blutgasanalysen. Die Beatmungsparameter wurden so angepasst, dass ein arterieller pCO_2 zwischen 35 und 45 mmHg sowie eine SpO_2 von >95% erreicht wurde.

Zur Aufrechterhaltung der Narkose bekamen die Tiere eine Dauerinfusion von 8-10 mg/(kg KG x h) Natrium-Pentobarbital und intermittierend 10-20 µg/kg KG Buprenorphin. Die perioperative Relaxation wurde durch eine Infusion von 0,1 mg/(kg KG x h) Pancuronium gewährleistet. Den Tieren wurde in den ersten drei Stunden 10000 IE/h Heparin infundiert. Über die gesamte Versuchsdauer wurde eine Ringer-Lösung mit 10 ml/(kg KG x h) appliziert, bei Bedarf während der Operation zusätzlich Hydroxyethylstärke 6% (HES). Während der Okklusion der Aorta kommt es regelmäßig zu einem Blutdruckanstieg. Dem wurde mit Nitroglycerin (1,7 mg/min), Esmolol (16,5 mg/min) und ATP (2-10 mg/min) begegnet, so dass der mittlere arterielle Druck (MAD) zw. 80-120% des Ausgangswertes gehalten wurde. Nach der Freigabe der Aorta und während der Reperfusionsphase kommt es wiederum regelhaft zu einem Blutdruckabfall, mit Hilfe einer kontinuierlichen Noradrenalininfusion wurde der MAD auf dem Ausgangswert vor Okklusion gehalten. Die Körpertemperatur wurde kontinuierlich rektal überwacht, es wurden keine regulatorischen Maßnahmen durchgeführt. Nach Beendigung der Reperfusionsphase wurde die Pentobarbital-Narkose vertieft und die Tiere mit 40 ml 1 M Kaliumchlorid getötet.

2.1.3 chirurgische Präparation

Nach der Intubation wurden die Versuchstiere fixiert, rasiert, gewaschen, mit einer Jodlösung sterilisiert und abgedeckt. Zur Urinableitung wurde ein suprapubischer Katheter in minimalinvasiver Technik in die Blase eingenäht. In die rechte A. femoralis wurde ein Katheter zur invasiven Messung des distalen MADs als Kontrolle eines korrekten distalen Verschlusses der Aorta gelegt. Über eine Schleuse in der linken A. femoralis wurde ein Ballonkatheter zur Okklusion der Abgänge der beiden Aa. renales vorgeschoben. Der intraaortale Ballonverschluß wurde deshalb gewählt, um mögliche Schädigungen der Aorta durch Klemmenplazierung und -abnahme zu vermeiden, und dennoch eine offene Versorgung eines Aneurysmas adäquat nachzubilden. Durch eine Schleuse in der rechten V.

femoralis wurde ein Katheter bis in die V. renalis vorgeschoben, die Lage wurde manuell kontrolliert. Hieraus wurden renalvenöse Blutproben gewonnen. Außerdem wurde über eine transversale Laparotomie die rechte Niere freipräpariert und eine Ultraschallsonde an die A. renalis zur Blutflussmessung und Kontrolle eines korrekten proximalen Verschlusses der Aorta angebracht. In die rechte V. jugularis wurde zur Messung des ZVD und zur Infusion von Medikamenten und Flüssigkeiten ein ZVK gelegt. Die rechte A. carotis communis wurde freipräpariert und mit einer Schleuse versehen, über die ein Katheter zur Messung des MAD und eine PICCO-Sonde eingeführt wurde. Mit Hilfe dieser Sonde lassen sich mit transpulmonaler Thermodilution und durch Pulskonturanalyse das Schlagvolumen, Herzzeitvolumen, intrathorakale Volumen und globale enddiastolische Volumen messen, welche als verlässliche und sensitive Marker für den Volumenstatus und die kardiale Vorlast gelten [39, 76].

Die rechte, freipräparierte Niere wurde biopsiert, der Defekt elektrokoaguliert und die Blutung mit Druckkompressen gestillt. Anschließend wurde der Bauch dreilagig verschlossen. Die operative Vorbereitung dauerte ca. 3 Stunden, dieser schloss sich eine zweistündige Erholungsphase bis zur ersten Infusion von Kochsalz oder cEPO-Fc an.

Abbildung 4 zeigt die beschriebene Situation nach Beendigung aller operativen Vorbereitungen.

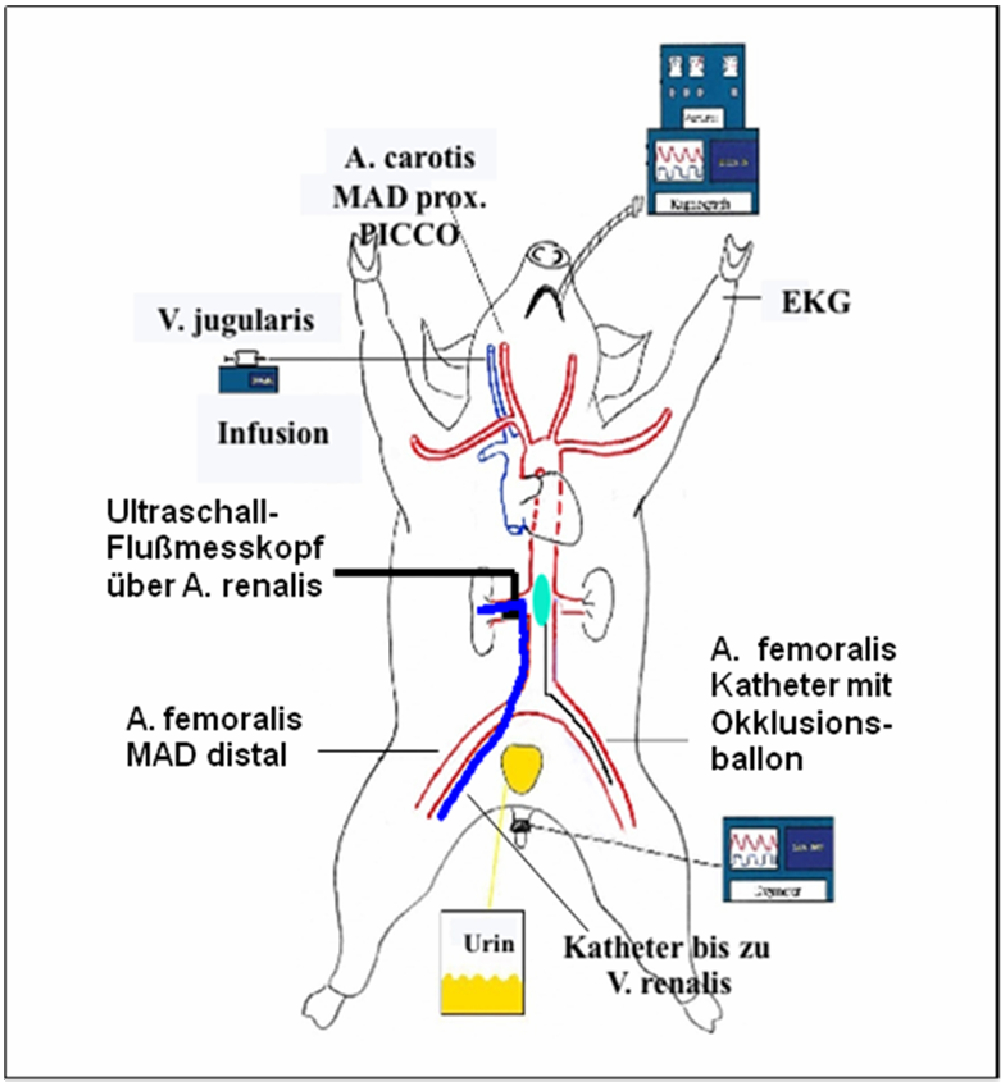

Abb. 4: Schematische Darstellung der Instrumentierung während des Versuches: Ballonkatheter zur intraaortalen Okklusion der Abgänge der beiden Aa. renales über li. A. femoralis; Messung des dist. MADs über re. A. femoralis; Katheter über re. V. femoralis bis zur V. renalis für renalvenöse Bluproben; Ultraschallsonde zur Blutflussmessung auf re. A. renalis; Infusion von Flüssigkeit und Medikamenten, Messung des zentralvenösen Drucks (ZVD) über re. V. jugularis; Messung des prox. MADs über re. A. carotis, dort auch die PICCO-Messung mit Thermodilution; Beatmungsgerät mit Monitor und Kapnographie; an drei Läufen Kontaktriemen zur EKG-Ableitung, neutrale Bezugselektrode unter dem Tier; Ableiten und Sammeln des Urin über suprapubischen Katheter

2.1.4 Messzeitpunkte und Probengewinnung

Zu Beginn der zweistündigen Erholungsphase wurde der erste Messzeitpunkt (MZP 1, 2 h prä) gesetzt. Hier wurde die erste arterielle und renalvenöse Blutprobe gewonnen, eine Blutgasanalyse und eine Thermodilution durchgeführt. Diesem Messzeitpunkt wurde auch die Nierenbiopsie zugeordnet, welche als Material für Histologie (in 4% Formaldehyd) und Comet Assay (frisch) diente. Die Tiere bekamen, je nach Gruppenzugehörigkeit, 30 min vor der Aortenokklusion eine Natriumchloridlösung (NaCl) oder cEPO-Fc 50 µg/kg KG über 30 min infundiert. Diese Dosierungsweise wurde gewählt da sie bereits in anderen

Experimenten zytoprotektiv nach Ischämie/Reperfusion wirkte [56, 104, 118]. Dem schloss sich ein Verschluss der Aorta für 120 Minuten an. Dieser Zeitrahmen wurde deshalb gewählt, da sich in zwei Pilotstudien an den FBM Tieren nach 90 min Ischämie nur eine mässige Veränderung der Kreatininclearance (Abfall von jeweils 80 und 48 auf 42 und 27 ml/min) und des Plasmakreatinins (Anstieg von jeweils 87 und 106 auf 101 und 113 µmol/l) zeigte. Sofort nach Freigabe der Aorta bekamen die Tiere eine zweite Infusion NaCl oder cEPO-Fc 50 µg/kg KG über 4 Stunden. Die Reperfusionsphase wurde auf insgesamt 8 Stunden festgelegt. Der zweite Messzeitpunkt (MZP 2, 4 h post) wurde 4 Stunden nach Okklusion, der letzte Messzeitpunkt (MZP 3, 8 h post) 8 Stunden nach Okklusion, also zum Ende des Versuches, festgesetzt. Zu diesen beiden Messzeitpunkten wurden sowohl Blutproben entnommen, als auch eine BGA und eine Thermodilution wie zu MZP 1 durchgeführt. Zusätzlich wurde zu allen MZP arterielles Vollblut in eine 4 ml Lithium-Heparin- Monovette für den Comet Assay abgenommen.

Sofort post mortem wurde die linke Niere entnommen und wie folgt verarbeitet: aus einem Nierenpol wurde eine Probe in flüssigen Stickstoff für Western Blot und EMSA Untersuchungen eingefroren. Die restliche Niere wurde sagittal aufgeschnitten, aus der Mitte zwei pyramidenförmige, Cortex und Medulla umfassende, etwa 5 mm dicken Schnitte gewonnen, in histologische Kassetten gebettet und in 4% Formaldehyd gelagert. Aus der anliegenden Rinde wurde ein etwa 4x4 mm großes Stück für den Comet Assay entnommen.

Das zu allen Messzeitpunkten gewonnene arterielle und renalvenöse Blut wurde in eine 9ml LH-Monovette abgenommen und zur Plasmagewinnung für 10 min bei 3000 rpm und 4°C zentrifugiert. Das Blutplasma wurde bis zur Bestimmung von Kreatinin, TNFα, IL-6, 8-Isoprostane, NGAL, Nitrat- und der Gesamtproteinkonzentration in Aliquoten zu je 1 ml bei -80°C eingefroren.

Der bis zum MZP 1, also 2 h vor Okklusion, gesammelte Urin wurde gemessen, 1% der Gesamtmenge abgefüllt und davon Aliquots zu 1 ml bei -80°C eingefroren. Der Rest wurde verworfen. Der vom diesen Zeitpunkt ab bis zum MZP 3, also 8 h nach Okklusion, gesammelte Urin wurde ebenso behandelt. Der Urin diente der Bestimmung von Natrium, Kalium, Kreatinin und NGAL.

Korrespondierende Blutelektrolyte wurden während der Bestimmung der BGA ermittelt.

Die Abbildung 5 gibt einen Überblick über den gesamten Versuchsablauf.

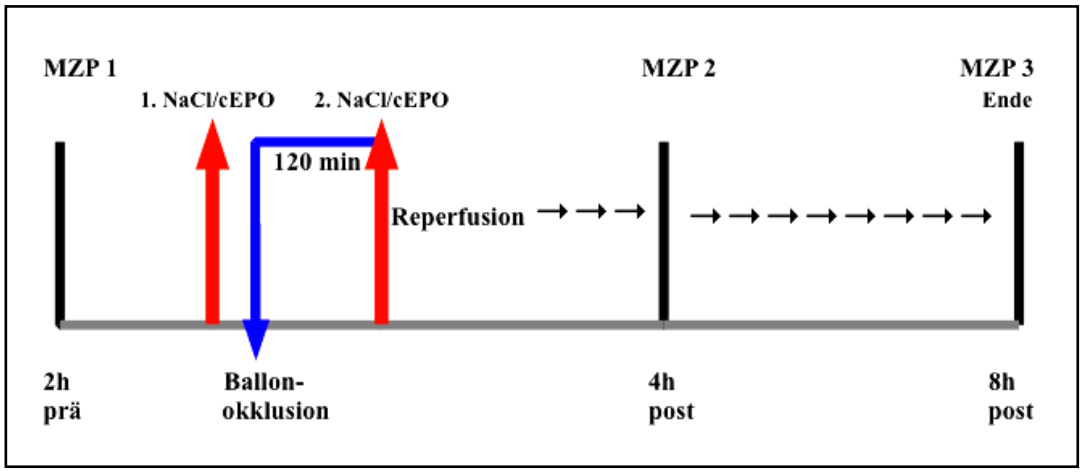

Abb. 5: Darstellung des zeitlichen Ablaufes des Versuches. Die variable Zeit der operativen Vorbereitung ist nicht dargestellt. 2 Stunden vor Okklusion (MZP 1, 2 h prä) wurden folgenden Proben entnommen: arterielles und renalvenöses Blut, eine Biopsie aus der rechten Niere und eine Urinprobe als 1% des Gesamturins bis zum MZP 1. 30 min vor Verschluss der Aorta erfolgte die erste Gabe von NaCl oder cEPO-Fc als Kurzinfusion über 30 min. Es folgte eine Aortenokklusion für 120 min, nach Freigabe der Aorta eine zweite NaCl oder cEPO-Fc Infusion über 4 Stunden. Nach 4 Stunden Reperfusion (MZP 2, 4 h post) wurde erneut arterielles und renalvenöses Blut entnommen. Nach 8 Stunden Reperfusion (MZP 3, 8 h post) wurden folgende Proben entnommen: arterielles und renalvenöses Blut und eine Urinprobe als 1% des Gesamturins zwischen MZP 1 und MZP 3. Anschließend wurde der Versuch beendet, die linke Niere für den Comet Assay und Histologie entnommen.

2.2 Bestimmungen aus Plasma und Urin

2.2.1 Blutgasanalyse

Die arterielle und renalvenöse Blutgasanalyse wurde am Radiometer-Vollautomaten durchgeführt. Die Bestimmung erfolgte zu allen Messzeitpunkten und intermittierend bei Verdacht auf metabolische und/oder respiratorische Entgleisung sowie zur Einstellung der Beatmungsparameter. Die Analyse lieferte Werte für den Sauerstoffpartialdruck (pO_2), welcher amperometrisch mit einer Sauerstoffsonde gemessen wurde, außerdem Kohlendioxidpartialdruck (pCO_2) und pH, welche potentiometrisch mit entsprechenden Elektroden gemessen wurden. Aus pH und pCO_2 wurde der base excess (BE) errechnet. Natrium und Kalium wurden mit Hilfe ionensensitiver Elektroden ebenso potentiometrisch gemessen. Laktat und Glukose wurden mit einer ionenselektiven Elektrode mit Laktatoxidase oder Glucoseoxidase zur enzymatischen Bildung von H_2O_2 bestimmt. Die Hämoglobinbestimmung erfolgte über das Prinzip der Absorptionsphotometrie.

2.2.2 Kreatinin und Kreatinin-Clearance

Kreatinin entsteht beim Muskelstoffwechsel aus Kreatin und wird mit einer relativ konstanten Rate in die Blutbahn abgegeben. Die Bestimmung des Plasma-Kreatininwertes gehört zu Routinediagnostik. Als eine harnpflichtige Substanz wird Kreatinin über die

Niere ausgeschieden, dabei glomerulär filtriert, nur im geringen Grade tubulär sezerniert. Deshalb eignet es sich gut als endogene Clearance-Substanz und wird standardmäßig zur Schätzung der glomerulären Filtrationsrate herangezogen. Die Kreatininclearance (KreaClear) wird nach folgender Formel bestimmt:

$$\text{KreaClear (ml/min)} = \frac{\text{Kreatinin Urin}(\mu\text{mol/l}) \text{ x Urinminutenvolumen}(\text{ml/min})}{\text{Kreatinin Plasma}(\mu\text{mol/l})}$$

Die KreaClear ist abhängig vom Körpergewicht und bei bereits leichter GFR-Einschränkung aussagekräftig [31].

Proben: Bei -80°C gelagertes Plasma aus arterieller Blutprobe und Urin (s. Messzeitpunkte und Probengewinnung).

Bestimmung: Das Urinminutenvolumen wurde aus der gesammelten Urinmenge bis 2 h vor Okklusion und der Urinmenge danach bis zum Ende des Versuches, d.h. 8 h nach Okklusion, sowie aus der bis zu dem jeweiligen Zeitpunkt verstrichenen Zeit ermittelt.

Die Kreatininbestimmung aus Plasma und Urin erfolgte mit der nicht enzymatischen Methode nach Jaffé: Pikrinsäure bildet mit Kreatinin ein gelboranges Kreatininpikrat-Komplex, welches photometrisch ausgewertet wird. Es wurde ein kommerziell erhältliches Kit verwendet.

Die KreaClear wurde aus den einzelnen Werten über die oben angegebene Formel für den Zeitpunkt 2 h vor Okklusion und den Zeitpunkt 8 h nach Okklusion ausgerechnet.

Die KreaClear ist auch beim Schwein ein guter und verlässlicher Parameter für die Bestimmung der GFR, wobei die Normwerte bei gesunden, freilaufenden Tieren bei 3,3 – 3,7 ml/min x kg KG liegen [109, 120, 122], bei gesunden Tieren unter Vollnarkose umgerechnet bei etwa 2,5 ml/min x kg KG [83].

2.2.3 Natrium

In diesem Versuch wird mit Hilfe der fraktionellen Natriumexkretion (frakt. NaEx), also dem Anteil des Natriums, der nach der Nierenpassage im Urin erscheint, die tubuläre Funktion der Niere erfasst. Natrium wird vor allem im proximalen Tubulussystem unter normalen Bedingungen bis zu 97% rückresorbiert, nicht mehr wie 3% des Plasmanatriums sollten bei einer gesunden Niere im Urin erscheinen.

Proben: Es wurde der Natriumwert der jeweiligen arteriellen BGA verwendet. Urin wurde aus den bei -80°C gelagerten Proben verwendet (s. Messzeitpunkte und Probengewinnung).

Bestimmung: Natrium wurde im Rahmen der arteriellen BGA am Radiometer bestimmt. Die Bestimmung erfolgte zu jeden MZP. Natrium im Urin wurde am selben Gerät nach derselben Methode 2 h vor und 8 h nach Okklusion bestimmt. Die fraktionelle Natriumexkretion zu diesen beiden Zeipunkten wurde nach folgender Formel berechnet:

$$\text{frakt. NaEx (\%)} = \frac{\text{Natrium Urin (mmol/l)} \times \text{Kreatinin Plasma (µmol/l)}}{\text{Natrium Plasma (mmol/l)} \times \text{Kreatinin Urin (µmol/l)}} \times 100$$

2.2.4 NGAL

Neutrophilen Gelatinase-assoziiertes Lipocalin (NGAL) wird nach einer Ischämie hochreguliert und erscheint bereits nach wenigen Stunden im Plasma und Urin. Es wird in proximalen Tubuli vor allem distaler Nephrone, welche auf Grund der Gefäßschaltung der Niere besonders schnell einer Hypoxie ausgesetzt sind, gebildet. NGAL wird auch stark rückresorbiert, sein Erscheinen im Urin ist also auch eine Folge einer tubulären Schädigung [41, 55].

Proben: Bei -80°C gelagertes Plasma aus arterieller Blutprobe und Urin (s. Messzeitpunkte und Probengewinnung).

Bestimmung: NGAL in Plasma und Urin wurde mit einem ELISA Kit des Herstellers BioPorto in Dänemark direkt bei diesem Hersteller bestimmt. Das Prinzip ist das eines kompetitiven Enzymimmunoassays (s. 8-Isoprostane Bestimmung weiter unten), die mit spezifischen Antikörper beschichteten Platten wurden nach Durchführung aller Reaktionsschritte photometrisch mit einem Plattenleser ausgemessen. Um durch Volumengabe möglicherweise entstandenen Verdünnungseffekte zwischen den Tieren zu umgehen, wurden die ermittelten Werte im Plasma zusätzlich auf das Plasmaprotein der entsprechenden Probe bezogen.

Bei NGAL handelt es sich um einen neuen Marker renaler Schädigung, inzwischen konnten erste Normwerte für das Schwein ermittelt werden. In der Regel steigen die Werte nach einer Ischämie um das 100fache, im Urin bis um das 10000fache an [51, 115].

2.2.5 Gesamtprotein

Die Gesamtproteinbestimmung sowohl in arteriellen wie renalvenösen Proben erfolgte nach der Biuret-Methode: Kupfer-Ionen reagieren dabei mit Stickstoff-Atomen in Peptidbindungen der Plasmaproteine. Bei 546 nm können diese rotvioletten Komplexe photometrisch gemessen werden, die Farbintensität ist proportional der Anzahl der Peptidbindungen [30]. Es wurde ein kommerziell erhältliches Kit verwendet.

2.2.6 TNFα

TNFα ist ein Immunmodulator und Vermittler der Entzündungsantwort. Seine Wirkung entwickelt es über den spezifische Rezeptor TNF I (Typ B oder p55) und TNF II (Typ A oder p75), der Hauptproduktionsort sind aktivierte Makrophagen, aber auch natural kill cells und glatte Muskeln von Gefäßen. Seine Konzentration steigt nach Ischämie- und Reperfusionsschäden an.

Proben: Bei -80°C gelagertes Plasma aus renalvenöser Blutprobe (s. Messzeitpunkte und Probengewinnung).

Bestimmung: TNFα lässt sich quantitativ mit Hilfe des Sandwich Enzyme-linked Immunosorbent Assays (ELISA) im Plasma nachweisen. Das Prinzip beruht auf der Bindung von TNFα an einen für das Schwein spezifischen monoklonalen Antikörper, welcher in den Vertiefungen einer Mikrotiterplatte immobil angebracht ist. Nach Auswaschen des nicht gebundenen TNFα wird ein Meerrettichperoxidase-gekoppelter Sekundärantikörper und nach Inkubation eine Substratlösung, welche Wasserstoffperoxid und ein Chromogen (Tetramethylbenzidin) enthält, hinzugefügt. Die Enzymreaktion führt zu einer Blaufärbung der Proben. Im letzten Schritt wird eine Stopplösung hinzugefügt (Salzsäure), was zu einem Gelbumschlag führt. Das Ergebnis wird bei 450 nm mit Korrektion bei 540 nm photometrisch ausgemessen, wobei die Menge des gebundenen TNFα proportional zu Farbintensität ist.

Es wurde ein kommerziell erhältliches Kit verwendet und das Assay nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Die ermittelten Werte wurden auf das Plasmaprotein der entsprechenden Probe bezogen.

2.2.7 IL-6

IL-6 ist ein multifunktionelles Zytokin, das unter anderen in reifen Lymphozyten synthetisiert wird. Während einer Schädigung durch Ischämie und anschließende Reperfusion wird IL-6 hochreguliert.

Proben: Bei -80°C gelagertes Plasma aus renalvenöser Blutprobe (s. Messzeitpunkte und Probengewinnung).

Bestimmung: IL-6 kann mit Hilfe des ELISAs im Plasma quantitativ nachgewiesen werden. Das Prinzip ist dasselbe wie bei TNFα, es wurden polyklonale schwein-spezifische Antikörper verwendet. Das Assay wurde nach Angaben des Herstellers durchgeführt, es wurde ein kommerziell erhältliches Kit verwendet. Die ermittelten Werte wurden auf das Plasmaprotein der entsprechenden Probe bezogen.

2.2.8 8-Isoprostane

8-Isoprostane sind Produkte der Lipidoxidation durch Sauerstoffradikale. Sie entstehen in Phospholipiden von Zellmembranen aus Arachidonsäure durch die Einwirkung von Superoxid und Phospholipase A_2.

Proben: Bei -80°C gelagertes Plasma aus renalvenöser Blutprobe (s. Messzeitpunkte und Probengewinnung).

Bestimmung: 8-Isoprostane lassen sich mit Hilfe des Enzymimmunoassays im Plasma nachweisen. Das Prinzip des kompetitiven EIAs beruht auf der Konkurrenz zwischen freien 8-Isoprostanen aus dem Tierplasma und einem vorhandenen 8-Isoprostane-Acetylcholinesterase-Konjugat um eine begrenzte Anzahl von spezifischen Kaninchen-Antiserum Bindungsstellen. Die so gebildeten Komplexe binden wiederum an immobil in den Vertiefungen der Mikrotiterplatte angebrachte Maus anti-Kaninchen IgGs. Alle nicht gebundenen Komplexe werden ausgewaschen und Ellman's Reagenz hinzugefügt, welches einen Farbumschlag zu Folge hat. Das Ergebnis wird photometrisch bei 412 nm ausgewertet, wobei sich die Intensität der gelben Farbe umgekehrt proportional zu der Menge an 8-Isoprostanen aus der Plasmaprobe verhält.

Es wurde ein kommerziell erhältliches Kit verwendet und das Assay nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Die ermittelten Werte wurden auf das Plasmaprotein der entsprechenden Probe bezogen.

2.2.9 Nitrat/Nitrit

Nitrat und Nitrit entstehen aus Stickstoffmonoxid (NO) im Blut, welches bei einer Hypoxie oder Ischämie vermehrt gebildet wird.

Proben: Bei -80°C gelagertes Plasma aus renalvenöser Blutprobe (s. Messzeitpunkte und Probengewinnung).

Bestimmung: Die Bestimmung erfolgte nach dem Prinzip der Chemolumineszenz. Die Reduktion von Nitrat/Nitrit zu NO erfolgte in der Reaktionskammer eines Nitric Oxide Analyser mit Hilfe von Vanadiumchlorid. Mit Hilfe von N_2 als Trägergas wurde das gebildete NO der Analysatoreinheit zugeführt, welche die Nitrat/Nitritkonzentration der jeweiligen Probe errechnete. Jede Probe wurde dreimal gemessen, anschließend ein Mittelwert gebildet [40]. Die ermittelten Werte wurden auf das Plasmaprotein der entsprechenden Probe bezogen.

2.3 Comet Assay

Zur Bewertung einer oxidativen Schädigung der DNA wurde der „Comet Assay" in seiner

alkalischen Version durchgeführt. Diese Methode ist gut geeignet, DNA-Strangbrüche auf Einzelzellebene zu detektieren. Die Alkaliversion entwindet und denaturiert die DNA zusätzlich und detektiert somit alkalilabile Stellen, d.h. Einzelstrangbrüche und Modifikationen am Zuckerphosphatgerüst oder Basenveränderugen, die nicht direkt zu Doppelstrangbrüchen führen [107].

Proben: 2 h vor und 8 h nach Okklusion wurde eine Nierenprobe und zu allen Messzeitpunkten eine renalvenöse Blutprobe wie beschrieben gewonnen.

Bestimmung: Jeweils 5 µl Blutprobe wurde mit 125 µl 0,5% LMP-Agarose bei 37°C gemischt, auf einen mit 1,5% MEEO-Agarose beschichteten Objektträger aufgetragen, zum Gelieren gebracht und in die vorbereitete Lyselösung bei 4°C gestellt. Durch Lyse kommt es zum Zerfall aller Membranen, die DNA des Zellkerns bleibt aber in ihrer Form erhalten (der Einfachheit halber im Text Zellkern genannt), die DNA kann jetzt im elektrischen Feld wandern. Die Nierenproben wurden manuell in einem eiskalten Glasmörser homogenisiert, jeweils 10 µl mit LMP-Agarose vermischt und wie die Blutprobe weiter behandelt. Alle Proben wurden über Nacht lysiert und am nächsten Tag weiter verarbeitet.

Alle Proben wurden einer Alkalydenaturierung mit kaltem Alkali-Elektrophoresepuffer mit pH > 13 unter Ausschluss von Sonnenlicht für 40 min unterzogen. Dieser Vorgang führt alkalilabile Stellen in DNA-Doppelstrangbrüche über. Somit können auch diese Stellen im Comet Assay detektiert werden [40].

Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte mit 25 V und 300 mA für 40 min. Danach wurden die Objektträger mit kaltem Neutralisationspuffer, destilliertem Wasser und Ethanol gespült und mindestens 24 h getrocknet.

Der Untersucher war bezüglich der Gruppeneinteilung der Tiere und Proben verblindet.

Die Auswertung erfolgte unter Fluoreszenzlicht mit 515-560 nm Anregungswellenlänge nachdem die Objektträger mit Ethidiumbromid bedeckt wurden. Es wurden jeweils 50 per Zufall auswählten Zellkerne mit dem Comet Assay II V2.11 Programm ausgewertet. Der Zellkern (der „Komet“) und die ausgewanderte DNA (der „Kometenschweif“) mussten einzeln liegen, sich überlagernde Kerne wurden nicht zur Zählung herangezogen. Das Programm errechnet das „Schweifmoment“ (Tailmoment) aus Kopfdurchmesser und Schweiflänge, Kopf- und Schweifleuchtintensität. Zusätzlich wird die Menge der DNA im Schweif mit der Distanz, die diese DNA im elektrischen Feld gewandert ist (also die Schwere der Schädigung) kombiniert. Für weitere statistische Berechnungen wurde der Mittelwert des Tailmoments aller 50 ausgewerteten Zellkerne einer Probe herangezogen.

Die Abbildung 6 zeigt schematisch das beschriebene Prozedere, Abbildung 7 zwei Beispielbilder aus der Auswertung.

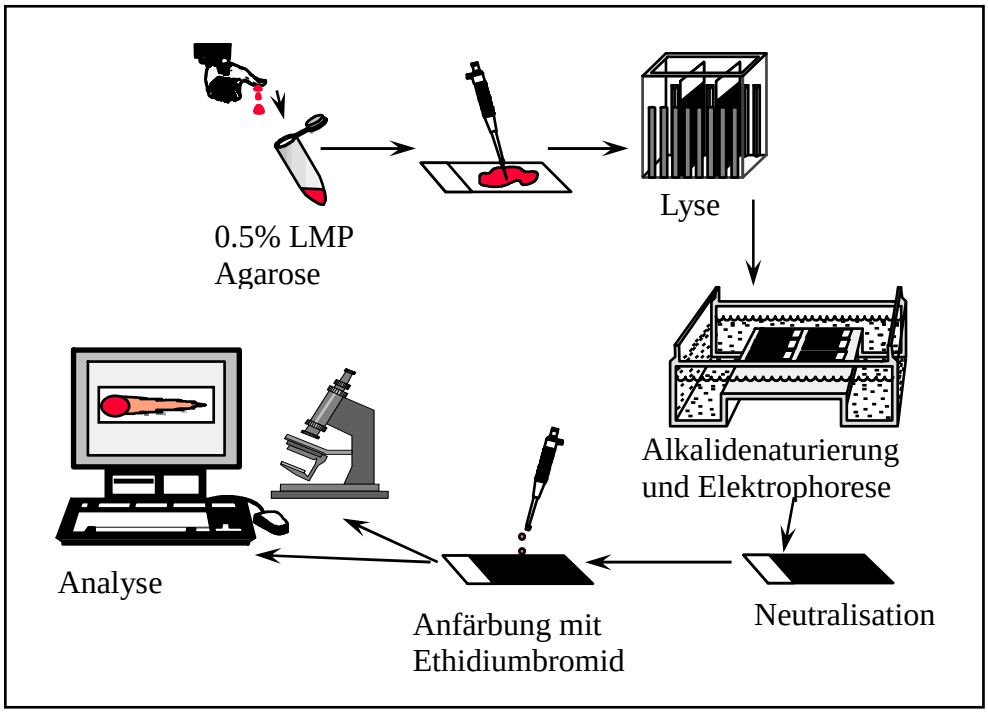

Abb. 6: schematische Darstellung des Comet Assays: Probe wird mit LMP-Agarose gemischt, auf Objektträger aufgetragen und lysiert. Es folgen Alkalidenaturierung der DNA und Elektrophorese. Die DNA wandert je nach Fragmentierungsgrad im elektrischen Feld, es entstehen Kometenschweife. Nach Neutralisation werden die Proben getrocknet, mit Ethidiumbromid angefärbt und unter einem Mikroskop mit Fluoreszenzlicht ausgewertet.
Grafik aus Speit und Hartmann, Methods Mol Biol 291:85-95 (2005)

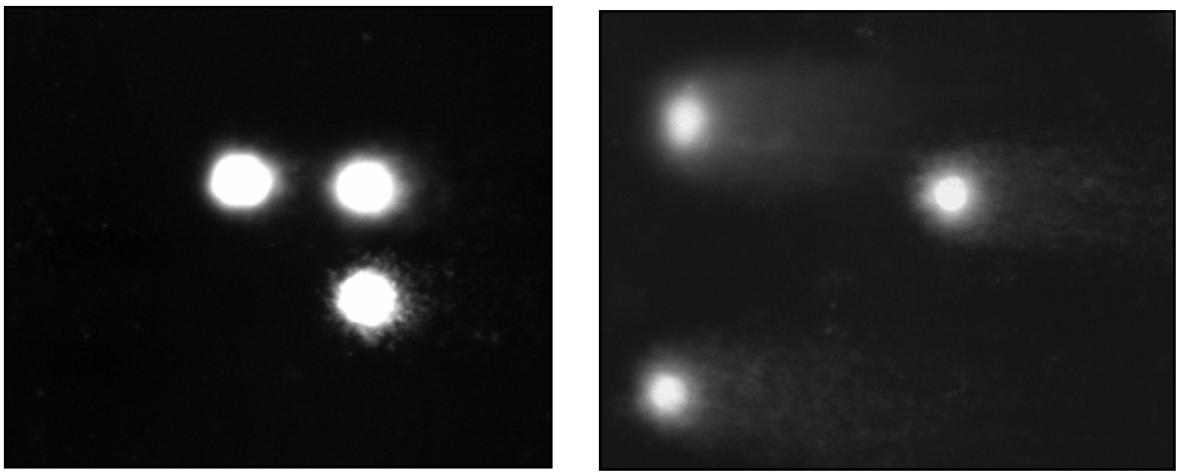

Abb. 7: Beispielbilder aus der Auswertung des Comet Assays: das linke Bild zeigt keine oder marginale DNA Schädigung, somit eine marginale Schweifbildung, das rechte Bild zeigt eine deutliche Schweifbildung, entsprechend einer ausgeprägten DNA Schädigung.

2.4 Western Blot und Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA)

2.4.1 Western Blot

Die Auftrennung der Proteine erfolgte nach dem Prinzip der diskontinuierlichen Gelelektrophorese nach Lämmli mit SDS-PAGE, das Blotten in der Semi-Dry-Technik, Visualisierung der Ergebnisse mit Peroxidase-Chemiluminiszenz.

Gesamtzelllysat

Das bei -80°C gefrorene Nierengewebe wurde leicht angetaut und in eiskaltem PBS homogenisiert und sofort mit eiskaltem 2x Lysepuffer versetz und für mindestens 30 min auf Eis lysiert. Sowohl PBS wie Lysepuffer wurden mit Proteaseninhibitoren versetzt. Anschließend wurde die Probe mit 20000 G bei 4°C für 30 min zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Die Probe wurde zusätzlich noch für 2x10 sec mit Ultraschall behandelt. Die Proteinmengen wurden photometrisch bestimmt (Methode nach Bradford). Die Konzentration der Proben wurde auf 20 µg Gesamtprotein auf 5 µl Lösung eingestellt.
Jede Probe wurde zur Denaturierung mit 2x Sample Puffer versetzt und für 10 min mit 95°C gekocht.

Auftrennung und Blotting

Sammelgel: Acrylamid-Bis 29:1 30%, Puffer bei pH 6,8, 10% APS und TEMED.
Laufgel: Acrylamid-Bis 29:1 30%, Puffer bei pH 8,8, 10% APS und TEMED.
Das Sammelgel wurde stets 4,5%ig hergestellt, das Laufgel in seiner Polymerkonzentration je nach Bedarf variiert, (s. Tab. 1). Die vorbereiteten Gele wurden mit 10 µl Probe, entsprechend 20 µg Protein, geladen und für 15 min bei 90 V, danach für 35 min bei 180 V aufgetrennt. Außerdem wurde ein Precision Plus Protein Standards Kaleidoskop zur Bestimmung der Proteingrößen mitgeführt.
Filterpapier und Nitrocellulose wurden im Blotting Puffer getränkt, der Transfer erfolgte in einer Semi-Dry Transfer Cell für 1 h bei 20 V. Die Nitrocellulose wurde mit Ponceaurot auf korrekten Transfer hin überprüft, mit TBS/T gewaschen und mit entfetteten Milchpulver in TBS/T (Blotto 5%) für 1 h bei Raumtemperatur geblockt. Anschließend wurde die Nitrocellulose 3x5 min mit TBS/T gewaschen und mit dem jeweiligen Primärantikörper (s. Tab. 1), in 10 ml TBS/T und 5% BSA gelöst, über Nacht bei 4°C inkubiert.
Im nächsten Schritt wurde 3x5 min mit TBS/T gewaschen, anschließend die Nitrocellulose mit Meerrettich-Peroxidase-konjugierten Sekundärantikörper nach Angaben der Hersteller für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Die Chemilumineszenz-Reaktion wurde durch die Zugabe von SuperSignal West Femto Substrat, gemäß den Herstellerangaben, gestartet.

Die Exposition auf Agfa Cronex 5 Filme wurde für etwa 1 min in der Dunkelkammer durchgeführt, die Filme anschließend entwickelt und fixiert.

Die fertigen Filme wurde eingescannt und die Intensität der Immunreaktion pro Bande mit Hilfe der ImageJ Software ausgewertet. (http://rsb.info.nih.gov/ij/) Die Ergebnisse wurden auf eine mitgeführte Standardprobe einer nichtischämischen Schweineniere bezogen.

Tab. 1: Auflistung der im Western Blot verwendeten Primärantikörper mit jeweiliger Verdünnung (in TBS incl. 0,1% Tween 20 und 5% BSA gelöst). Für die Auftrennung der Proteine wurden je nach Antikörper unterschiedliche Acrylamid-Konzentration (in %) der Laufgele verwendet. Die Meerrettich-Peroxidase-konjugierten Sekundärantikörper waren entweder Ziege anti-Kaninchen 1:15000 oder Pferd anti-Maus 1:3000.
Abkürzungen: p: polyklonarer Antikörper, m: monoklonarer Antikörper

Primärantikörper	**Konz.**	**Laufgel**
p rabbit anti-HIF-1α	1:1000	5%
m mouse anti-HO-1	1:2000	10%
p rabbit anti- IκBα	1:1000	10%
p rabbit anti-i-NOS	1:2000	5%
p rabbit anti-Nitrotyrosin	1:1000	10%
p rabbit anti-XIAP	1:1500	7,5%
m rabbit anti-Bcl-XL	1:5000	10%
p rabbit anti-cleaved Caspase-3	1:1000	15%

2.4.2 EMSA zum Nachweis von NF-κB

Dieses Assay dient dem Nachweis von DNA/RNA-bindenden Proteinen wie den Transkriptionsfaktoren, zu denen auch NF-κB gehört. Die gesuchten Proteine werden mit radioaktiv markierten Oligonukleotiden inkubiert und auf nativem Gel aufgetrennt. Mit der radioaktiven Strahlung wird ein Röntgen-Film belichtet.

Gesamtzelllysat

Die Proben wurden auf dieselbe Weise wie beim Western Blot gewonnen und behandelt.

Die Konzentration der Proben wurde auf 10 µg Gesamtprotein in 5 µl EMSA Puffer eingestellt.

radioaktives Labeling

20 µl eines radioaktiven Labeling Ansatzes wurden hergestellt. Dazu wurden 3,6 µg eines Doppelstrang-Oligonukleotids mit einer entsprechenden NF-κB-Bindungsstelle (s.Abbildung 8) mit 5 µl (γ^{32}P)-ATP, 1 µl T4 Polynukleotidkinase, 2 µl Polynukleotid Kinase Puffer und 8,4 µl Aqua dest. gemischt. Der Einbau radioaktiven Phosphats erfolgte

für 30 min bei 37°C, das Oligonukleotid wurde mit dem QIAquick Gel Extraction Kit nach Angaben des Herstellers aufgereinigt.

5’- AGT TGA GGG GAC TTT CCC AGG C - 3’
3’ - TCA ACT CCC CTG AAA GGG TCC G - 5’

Abb. 8 NF-κB Konsensusoligonucleotid. Rot markiert ist die Bindungsstelle für NF-κB/c-Rel Homodimer- und Heterodimerkomplexe.

Auftrennung

Es wurde ein der Probenmenge entsprechender Mastermix (radioaktiv markierte Oligonukleotide und Reaktionspuffer) hergestellt. 50 000 cpm der markierten Oligonukleotide (entsprach 5 µl des Mastermixes) wurden mit jeder Probe für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. 10 µl, entsprechend 10 µg Gesamtprotein pro Spalte, wurden auf ein 7% Nativgel geladen und im Laufpuffer (0,5x TBS) aufgetrennt. Zuvor wurde das Gel für 30min mit 100V äquilibriert. Nach 3h bei 200V wurden die Gele für 30 min fixiert (15% Methanol, 5% Eisessig, 5% Glycerol, Aqua dest.), für 5 min in Aqua dest. getaucht und auf Whatmann-Papier aufgezogen. Mit Plastikfolie umhüllt wurden die Gele bei 80˚C für 1h getrocknet, über Nacht auf eine Phosphorimager Bildplatte exponiert, diese mit Fuji Phosphorimager FLA-3000 eingelesen und die Ergebnisse mit Aida-Software ausgewertet. Die Ergebnisse wurden auf eine mitgeführte Standardprobe einer nichtischämischen Schweineniere bezogen.

2.5 Histologie

Die histologische Aufarbeitung erfolgte nach folgenden Schritten: die entnommene Niere oder Nierenbiopsie wurde, wie bereits erwähnt, in ca. 5 mm dicke Scheibchen geschnitten und 3-7 Tage in histologischen Einbettkassetten in 4% Formaldehyd fixiert. Anschließend wurden die Schnitte in der Sektion der Pathologie am Safranberg, Steinhövelstraße 9, 89075 Ulm, maschinell entwässert und in Paraffinblocks eingebettet. Am Mikrotom wurden 5 µm Schnitte angefertigt und auf Objektträger aufgezogen. Die Schnitte wurden mit N0 plus Tiernummer für die Nierebiopsie zu MZP 1 und N1 plus Tiernummer für die Nierenproben zu MZP 3 beschriftet und gesammelt.

Alle Schnitte wurden gleichzeitig der periodic acid-Schiff Reaktion (PAS) unterzogen.

Bei dieser Reaktion kommt es zur Oxidation von Glycolgruppen zu Aldehyd durch Perjodsäure, fuchsinschwefelige Säure im Schiffschen Reagenz kann sich an diese

Aldehydgruppen anlagern und entfaltet dort ihre chromogene Eigenschaft: Glykogen, Glokyproteine, -lipide und Mukopolysaccharide färben sich magentarot. Diese Bestandteile findet man in Zucker speichernden Zellen, Bindegewebe, Basal- und Zellmembranen.

Eine Gegenfärbung mit Hämalaun lässt die Zellkerne blau-violett hervortreten.

Durchführung der PAS-Reaktion

Die Schnitte wurden zur Entparaffinierung in Xylol getaucht, anschließend mit absteigenden Konzentrationen von Ethanol und Aqua dest. rehydriert. Bei Raumtemperatur wurden die Schnitte in eine Perjodsäure-Lösung getaucht, mehrmals gespült, und anschließend ins Schiffsche Reagenz getaucht. Nach Ablauf der Reaktion wurden die Schnitte unter fließendem Wasser gespült, mit Mayers Hämalaun gegengefärbt und nochmals gespült. Zur Dehydrierung wurden die Schnitte in aufsteigende Konzentrationen von Ethanol getaucht und direkt aus Xylol mit einem wasserfreien Eindeckmittel auf Objektträger gezogen und getrocknet.

2.6 Immunhistochemie zur Bestimmung von EPO-R

Zur immunhistochemischen Untersuchung auf das Vorhandensein von EPO-R im Nierengewebe wurden Schnitte aus gesammelten Paraffinblocks 2 h vor Aortenokklusion, wie oben beschrieben, verwendet. Am Mikrotom wurden 5 µm Schnitte angefertigt und auf Objektträger aufgezogen, die Proben anschließend in Xylol und absteigenden Konzentration von Ethanol und zuletzt im destillierten Wasser rehydriert. Es folgte eine hitzeinduzierte Wiedergewinnung des Antigens in der Mikrowelle (HIAR: heat induced antigen retrieval) mit Citratpuffer pH 6 und Aqua dest. Die Proben wurden mit 10% Ziegenserum für 20 min bei Raumtemperatur geblockt, anschließend in TBS gespült. Es folgte eine 60minütige Inkubation mit dem EPO-R-Primärantikörper 1:50 verdünnt bei Raumtemperatur, anschließend wurden die Proben erneut in TBS gewaschen und es folgte eine 30minütige Inkubation mit den Sekundärantikörperkomplex Alkalische-Phosphatase-anti-Alkalische-Phosphatase (APAAP Methode) und Visualisierung des Primärantikörpers mit einem roten Chromogen nach Angaben des Herstellers (Dako APAAP REAL, Dako Cort.). Es erfolgte eine Gegenfärbung mit Mayers Hämalaun zur Darstellung der Zellkerne und schließlich wurden die Proben in aufsteigenden Konzentrationen von Ethanol dehydriert und aus Xylol mit einem wasserfreien Eindeckmittel auf den Objektträgern konserviert. Diese Proben wurden mit denen vor einer Aortenokklusion gewonnen Nierenbiopsien aus einem Versuch mit gesunden jungen deutschen Landschweinen

verglichen, welche immunhistochemisch genauso aufgearbeitet wurden. Alle Proben wurden mit einem Zeiss Axio Imager A1 Mikroskop bei 10facher Vergrößerung ausgewertet, die Angabe erfolgte als densitometrischer Mittelwert der Gesamtrotfärbung einer Probe.

2.7 perioperative Parameter

2.7.1 Kreislauf und Herzfunktion

Bezüglich der Kreislaufsituation und der Herzfunktion der Tiere wurden folgende Größen betrachtet:

- Herzfrequenz (HF)
- mittlerer arterieller Druck (MAD) über eine invasive Blutdruckmessung, proximal in der A. carotis (MAD prox), distal in der A. femoralis (MAD dist)
- zentralvenöser Druck (ZVD) über zentralen Venenkatheter (ZVK) in der V. jugularis
- Blutfluss in der rechten A. renalis (A. ren BF) über auf der Arterie befestigten Ultraschallmesskopf
- Schlagvolumen (SV) des Herzens, aus Herzzeitvolumen und Herzfrequenz berechnet
- intrathorakales Blutvolumen (ITBV), also das Blutvolumen, dass sich in allen vier Herzkammern und in der Lungenstrombahn befindet
- cardiac output index (COi), aus auf das Gewicht des Tieres bezogenes Herzzeitvolumen (HZV) berechnet

Die letzten zwei Parameter (ITBV und HZV) wurden über eine Thermodilution bestimmt. Hierzu wurde über den ZVK eine 6 °C kalte NaCl-Lösung in die Halsvene gespritzt, der Temperaturabfall und -verlauf über einen Thermistor an der PICCO-Katheterspitze in der A. carotis gemessen. Die kalte Flüssigkeit hat folglich das Herz und die Lunge passiert. Ein Analysegerät errechnete aus der Änderung der Temperatur die oben angegeben Parameter.

Der Noradrenalinbedarf nach Verschluss der Aorta bis zum Versuchsende wurde aus der Differenz der Gewichtes der Perfusorspritze vor und nach Gebrauch ausgerechnet, der Gesamtverbrauch wurde auf das Körpergewicht bezogen und in µg/kg KG ausgedrückt.

2.7.2 Blutgase, Elektrolyte, Säuren-Basen-Haushalt

Bezüglich der Blutgase, des Säuren-Basen-Haushaltes und der Elektrolyte wurden

folgenden Größen betrachtet:

- Kohlendioxidpartialdruck (pCO_2)
- Sauerstoffpartialdruck (pO_2)
- pH
- base excess (BE)
- Natrium (Na)
- Kalium (K)
- Laktat
- Hämoglobin (Hb)
- Blutglucose (BZ)

Alle Werte wurden in Rahmen der BGA aus arteriellem Blut bestimmt.
Die Körperkerntemperatur wurde über eine rektale Sonde gemessen, die Tiere wurden weder gekühlt noch gewärmt.

2.8 statistische Auswertung

Alle gewonnenen Rohdaten wurden in Excel tabellarisch aufgelistet und aus ihnen Median, Quartile, Maxima und Minima ermittelt und graphisch als Boxplots mit Hilfe des SigmaPlot Programms dargestellt.
Für die weitere statistische Auswertung wurden mit dem SigmaStat Programm folgende Tests durchgeführt: der Mann-Whitney Rank Sum Test zum Vergleich zweier unabhängiger Stichproben, hier der Kontrollgruppe und der cEPO Gruppe, zu einem Messzeitpunkt. Dieser Test wurde für jeden MZP einzeln durchgeführt. Der Wilcoxon Signed Rank Test zum Vergleich einer Stichprobe zu zwei unterschiedlichen Messzeitpunkten. Der Friedman Repeated Measurements ANOVA (analysis of variance) on Ranks Test zum Vergleich einer Stichprobe zu mehr als zwei Messzeitpunkten, ergänzend dazu der Dunn Intergruppentest.
Werte mit $p < 0,05$ wurden als signifikant gewertet.

2.9 Reagenzien, Materialien, Geräte

2.9.1 Operationsmaterialien

- Azaperon Stresnil (Janssen, Neuss)
- Propofol-Lipuro 2% (Braun, Melsungen)
- Ketaminhydrochlorid Ketavet (Pfizer, Karlsruhe)
- Atropin Atropinsulfat (Braun, Melsungen)

- Pancuronium duplex-Actavis (Actavis, Langenfeld)
- Buprenorphin Temgesic (Essex Pharma, München)
- Pentobarbital-Natrium Narcoren (Merial, Hallbergmoos)
- Heparin-Natrium Braun Multi (Braun, Melsungen)
- Ringerlösung-Fresenius E (Fresenius Kabi, Bad Homburg)
- Hydroxyethylstärke Vitafusal 6% HES 6 130/0,42 RAc (Serumwerk Bernburg, Bernburg)
- Kaliumchlorid 1M Lösung Fresenius (Fresenius Kabi, Bad Homburg)
- Noradrenalin Arterenol (Sanofi-Aventis, Frankfurt am Main)
- Natriumchloridlösung Isotone Kochsalz-Lösung 0,9% (Braun, Melsungen)
- Cystofix-Katheter Freka®Cyst Standard 8 cm – CH 10 (Fresenius Kabi, Bad Homburg)
- Katheter 4F und 8,5F Multipurpose A1 (Cordis, Roden, Niederlande)
- Katheterschleuse 4F Introducer-Set PV3240 (Pulsion, München)

2.9.2 Operationsgeräte

- Beatmungsgerät Serve Ventilator 900C (Siemens, Erlangen)
- 66S™-Monitor zur hämodynamischen Überwachung (Hewlett Packard, Palo Alto, CA, USA)
- Capnomac Ultima zur Überwachung der Beatmung (Datex Instrumentation Corp., Helsinki, Finnland)
- Pulsoxymeter Radical-7 (Masimo, Irvine, CA, USA)
- Infusomat secura (Braun, Melsungen)
- Perfusor secura P (Braun, Melsungen)
- Picco Plus mit Pulsion Cold Z-021 (Pulsion Medical Systems, München)
- Ultraschall Nierensonde T206 small animal blood flow meter (Transonic Systems Inc., Ithaca, NY, USA)

2.9.3 Laborgeräte

- Blutgasanalysegerät ABL System 625 (Radiometer, Copenhagen, Dänemark)
- Zentrifuge Hettich Rotina 38R (Hettich, Bäch, Schweiz)
- Mixing-Block MB-102 (Bioer, Biozym Scientific, Hess. Oldendorf)
- Heizblock Thermostat 5320 (Eppendorf, Hamburg)
- Elektrophorese-Stromversorgungsgerät Consort EV231 (LTF Labortechnik, Wasserburg)
- Elektrophoresekammer Sub-Cell GT Basic (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)

- Eismaschine Scotsman AF80 (Frimont, Mailand, Italien)
- Kühlschrank Glass Line (Liebherr, Bulle, Schweiz)
- Bosch Mikrowellenherd 842C (Robert Bosch GmbH, Gerlingen)
- Ultra Turrax 25 (Janke & Kunkel, IKA Labortechnik, Staufen)
- TransBlot SD Semi-Dry Transfer Cell (Bio-Rad, München)
- Olympus BX41 Mikroskop mit Olympus BX Microcam C-Mount 0,45x
- Zeiss Axio Imager A1 Mikroskop mit EC Plan-NEOFLUAR Objektiv
- Nitratanalysegerät Sievers 280 NOA (FMI GmbH, Seeheim/Ober-Beerbach)
- Photometer Spectronic Genesys 2 (Milton Roy, Ivyland, PA, USA)
- pH-Meter Mettler MP220 (Mettler Toledo, Giessen)
- Waage ScalTec SBC31 (ScalTec, Heiligenstadt)
- Pipette Eppendorf Reference (Eppendorf, Hamburg)
- Hamiltonpipette #705 (Hamilton Company, Reno, NV, USA)

2.9.4 Chemikalien und Reagenzien

- GeneQuant pro zur Proteinmengenbestimmung mit Protein Assay 595 (Amersham GE Healthcare, Freiburg, München)
- Protein Assay Dye Reagent 1:5 (Bio-Rad, München)
- Precision Plus Protein Standards Kaleidoskop (Bio-Rad, München)
- Complete mini Proteaseninhibitorenmix (Roche Diagnostic, Mannheim)
- Acrylamid-Bis 29:1 30% (SERVA Electrophoresis, Heidelberg)
- Acrylamid-Bis 29:1 40% (SERVA Electrophoresis, Heidelberg)
- TEMED (Fluka Biochemica, Buchs, Schweiz)
- SuperSignal West Femto Substrate (Thermo Scientific, Bonn, München)
- Tween 20 (Sigma-Aldrich, Steinheim)
- T4 Polynukleotidkinase (New England BioLabs, Frankfurt/Main)
- Polynukleotid Kinase Puffer (New England BioLabs, Frankfurt/Main)
- Polydeoxyinosin/-deoxycitidin-Natriumsalz #sc-286691(Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg)
- Triton X-100 (Sigma-Aldrich, Steinheim)
- Dimethylsulfoxid (DMSO, Merck, Darmstadt)
- LMP-Agarose (Sigma-Aldrich, Steinheim)
- MEEO-Agarose (Merck, Darmstadt)
- Ethanol 99,8% vergällt (Sigma-Aldrich, Steinheim)
- Ethanol 99,9% (Sigma-Aldrich, Steinheim)

- Xylol (Sigma-Aldrich, Steinheim)
- Dako APAAP REAL (Dako, Hamburg)
- Bovine Serum Albumin (BSA) (Sigma-Aldrich, Steinheim)
- Tris-Salzsäure (Sigma-Aldrich, Steinheim)
- EDTA (Sigma-Aldrich, Steinheim)
- EGTA (Sigma-Aldrich, Steinheim)
- Tergitol Type NP-40 (Sigma-Aldrich, Steinheim)
- Glycerol (Sigma-Aldrich, Steinheim)
- Natriumvanadat (Sigma-Aldrich, Steinheim)
- p-Nitrophenylphosphat (Sigma-Aldrich, Steinheim)
- Dithiothreitol (Sigma-Aldrich, Steinheim)
- β-Glycerophosphat (Sigma-Aldrich, Steinheim)
- Leupeptin (Roche Diagnostic, Mannheim)
- Natriumdodecylsulfat (SDS) (Sigma-Aldrich, Steinheim)
- β-Mercaptoethanol (Sigma-Aldrich, Steinheim)
- Bromophenolblau (Merck, Darmstadt)
- Ammoniumpersulfat (Sigma-Aldrich, Steinheim)
- Glycin (Sigma-Aldrich, Steinheim)
- Tris Base (Sigma-Aldrich, Steinheim)
- Methanol (Sigma-Aldrich, Steinheim)
- Tris Buffered Saline (TBS) (Sigma-Aldrich, Steinheim)
- Borsäure (Sigma-Aldrich, Steinheim)
- Uvasol, Dimethylsulfoxid (DMSO) (Merck, Darmstadt)
- Natronlauge 1M (Merck, Darmstadt)
- Na_2EDTA (Sigma-Aldrich, Steinheim)
- Phosphate Buffered Saline (PBS) (Sigma-Aldrich, Steinheim)
- Ethidiumbromid (Carl Roth, Karlsruhe)
- Stickstoff (gasförmig und flüssig) (MTI Industriegase, Ulm)

2.9.5 Antikörper

- goat anti rabbit Sekundärantikörper (Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg)
- horse anti mouse Sekundärantikörper (Cell Signaling Technology, New England BioLabs, Frankfurt/Main)
- NF-κB Oligonucleotid # sc-2505 (Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg)
- EPO-R polyklonaler Kaninchenantikörper # sc-5624 (Santa Cruz Biotechnology,

Heidelberg)

- HIF-1α polyklonaler Kaninchenantikörper # 3716 (Cell Signaling Technology, New England BioLabs, Frankfurt/Main)
- HO-1 monoklonaler Mausantikörper # OSA-111 (Stressgen Enzo Life Sciences, Lörrach)
- IκBα polyklonaler Kaninchenantikörper # sc-371 (Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg)
- iNOS polyklonaler Kaninchenantikörper # 610333 (BD, Heidelberg)
- Nitrotyrosin polyklonaler Kaninchenantikörper # 9691 (Cell Signaling Technology, New England BioLabs, Frankfurt/Main)
- XIAP polyklonaler Kaninchenantikörper # 2042 (Cell Signaling Technology, New England BioLabs, Frankfurt/Main)
- Bcl-XL polyklonaler Kaninchenantikörper # 2764 (Cell Signaling Technology, New England BioLabs, Frankfurt/Main)
- cleaved Caspase 3 polyklonaler Kaninchenantikörper # 9661 (Cell Signaling Technology, New England BioLabs, Frankfurt/Main)

2.9.6 Käuflich erhältliche Analysekits

- Gesamtprotein SYS1 BM/Hitachi 704/911 (Roche Diagnostics, Mannheim)
- QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Hilden)
- 8-Isoprostane EIA Kit Cat.Nr. 516351 (Cayman Chemical Company, Ann Arbor, USA)
- Quantikine porcine TNFalpha EIA Kit (R&D Systems, Abingdon, UK)
- Quantikine porcine IL-6 EIA Kit (R&D Systems, Abingdon, UK)
- NGAL ELISA Kit 036 (BioPorto, Gentofte, Dänemark)
- Kreatinin Kit (Randox Laboratories, Crumlin, UK)
- Periodic Acid-Schiff Kit (Sigma-Aldrich, Steinheim)

2.9.7 Software

- Comet Assay II Version 2.11 (Perceptive Instruments Ltd.)
- Excel (Windows Microsoft Office 2003)
- ImageJ Software (http://rsb.info.nih.gov/ij)
- Aida Image Analyzer
- Axio Imager 1A
- SigmaPlot Version 8.0 2002 (Systat Software)
- SigmaStat Version 3.0 2003 (Systat Software)

2.9.8 Medien, Standardlösungen und Puffer

Alle Medien und Lösungen wurden, soweit nicht anders beschrieben, mit bidest. H_2O hergestellt.

Western Blot

- Lysepuffer: 50 mM Tris-HCl pH 7,5, 250 mM NaCl, 3 mM EDTA, 3 mM EGTA, 1% Triton X-100, 0,5% NP40, 10% Glycerol
- Proteaseinhibitoren: 0,1 mM Natrium-Vanadat, 2 mM p-Nitrophenylphosphat (PNPP), 2 mM Dithiothreitol (DTT), 1 mM β-Glycerophosphat, 10 µM Leupeptin, 1 Tablette Complete mini Proteaseninhibitorenmix
- EMSA Puffer nach Baumann: 100 mM Tris-HCl pH 7,9, 500 mM NaCl, 10 mM EDTA, 10 mM DTT, 20% Glycerol, 100 µg BSA, 1:10 in Aqua dest., mit Proteaseinhibitoren wie Lysepuffer)
- 2x Sample Puffer: 6% SDS, 250 mM Tris-HCl pH 6,8, 20% Glycerol, 6,7% β-Mercaptoethanol, eine Spatelspitze Bromophenolblau)
- Sammelgel: Acrylamid-Bis 29:1 30%, Aqua dest., Puffer pH 6,8 bestehend aus 0,5 M Tris-HCl, 0,4% SDS (Natriumdodecylsulfat) und Aqua dest., sowie 10% Ammoniumpersulfat (APS) in Aqua dest. und TEMED
- Laufgel: Acrylamid-Bis 29:1 30%, Aqua dest., Puffer pH 8,8 bestehend aus 1,5 M Tris-HCl, 0,4% SDS und Aqua dest., sowie APS und TEMED
- Laufpuffer mit pH 8,8: 1,9 M Glycin, 250 mM Tris Base und 1% SDS, 1:10 in Aqua dest.
- Blotting Puffer: 2,4 M Tris Base, 1,9 M Glycin, 64,2 mM SDS in Aqua dest, 100 ml in 200 ml Methanol verdünnt
- TBS/T: 1x TBS pH 7,6, 0,1% Tween 20
- Blotto: 5% entfettetes Milchpulver in TBS/T

EMSA

- Markierungsmix für das NF-κB Oligonukleotid: 5 µl (γ^{32} P)-ATP, 1 µl T4 Polynukleotidkinase, 2,0 µl Polynukleotid Kinase Puffer
- EMSA Mastremix: 7,2 µl der radioaktiv markierten Oligonukleotide, 42,5 µl 10x EMSA Puffer, 42,5 µl Poly-Deoxyinosin-Deoxycytidin-Säure als Natriumsalz, 21,3 µl DTT 20 mM und 311,5 µl Aqua dest.
- Nativgel 7%: Acrylamid-Bis 29:1 40%, Aqua dest., 10x TBE Puffer pH 8,8, APS und TEMED

– 10x TBE Puffer pH 8,8: 89 mM TRIS Base, 89 mM Borsäure, 2 mM Dinatrium-EDTA

Comet Assay

- Lyselösung: 1ml Triton X-100, 10 ml DMSO, 89 ml Stammlösung, mit Aqua dest. auf 890 ml aufgefüllt, mit NaOH auf pH 10 eingestellt
- Stammlösung: 2,5 M NaCl, 100 mM Na_2EDTA, 10 mM Tris-Base
- LMP-Agarose: 5mg/ml PBS, 2x aufgekocht und aliquotiert
- Alkali-Elektrophoresepuffer: 300 mM NaOH, 1 mM Na_2EDTA, pH über 13
- Neutralisationspuffer: 48,5 mg/ml Tris-Base in Aqua dest. mit HCl auf pH 7,5 eingestellt

Immunhistochemie

- TBS Puffer pH 8,0
- Detergent: 1 µl Tween (T 20) auf 100 ml TBS
- Ziegenserum 10%: 10 ml TBS, 1 µl T 20 und 10 µl Ziegenserum

2.9.9 Sonstige Verbrauchsmaterialien

- S-Monovette Blutröhrchen (Vollblut, Lithium-Heparin, Blugase) (Monovette, Sarstedt, Nümbrecht)
- Neo-Mount wasserfreies Eindeckmittel (Merck, Darmstadt)
- Objektträger mit Mattrand (Marienfeld, Lauda-Königshofen)
- Deckgläser (Menzel-Gläser, Braunschweig)
- Histosette II histologische Cassette (Simport, Beloeil, Canada)
- Küvette 4ml 1 cm x 1 cm (PS Sarstedt, Nürmbrecht)
- Eppendorf-Reaktionsgefäße (Eppis) (Eppendorf, Hamburg)
- Rotabilo sterile Spritzenfilter (Roth, Karlsruhe)
- Perfusor-Spritzen 50 ml (Braun, Melsungen)
- Pippetenspitzen (Eppendorf, Hamburg)

3. Ergebnisse

Allgemeine Bemerkungen: alle Werte beziehen sich auf jeweils 7 Tiere pro Gruppe, außer anderweitig angegeben. Durch anatomische Gegebenheiten war es bei zwei Tieren der Kontrollgruppe nicht möglich, den Ultraschallmesskopf zu platzieren, bei einem Tier der Kontrollgruppe konnte kein renalvenöser Katheter gelegt werden.

3.1. perioperative Parameter

Während des Versuchsverlaufs wurden neben der kontinuierlichen Überwachung zu allen drei Messzeitpunkten ausgewählte Parameter, wie unter Punkt 3.7. aufgeführt, erhoben und ausgewertet.

Tabelle 2 zeigt die Ergebnisse zu Kreislauf, Herzfunktion und Noradrenalinbedarf, Tabelle 3 zeigt die Ergebnisse zu Blutgasen, Elektrolyten, Säuren-Basen-Haushalt und Temperaturverlauf.

Tab. 2: Tabellarische Übersicht der Werte der ausgewählten Parameter für Hämodynamik und Herzfunktion. Angabe als Median (Minimum;Maximum) aller Werte (A.ren BF Kontrollgruppe n = 5). # zeigt $p < 0,05$ verglichen mit Werten vor Ballonokklusion, § zeigt $p < 0,05$ verglichen mit der Kontrollgruppe. MZP: Messzeitpunkt; HF: Herzfrequenz, SV: Schlagvolumen; COi: cardiac output index; ITBV: intrathorakales Blutvolumen; A.ren.BF: Blutfluß durch die A. renalis; MAD: mittlere arterielle Druck; ZVD: zentralvenöse Druck; NoA: Noradrenalinbedarf

		vor Aortenokklusion	4 h Reperfusion	8 h Reperfusion
HF Schläge/min	Kontrolle cEPO	92 (79;113) 103 (83;128)	138 (121;168) # 112 (82;134) §	145 (78;178) # 123 (72;140)
SV ml	Kontrolle cEPO	50 (36;69) 61 (49;68)	41 (20;53) # 59 (34;67) §	35 (15;56) # 59 (34;68) §
COi ml/min/kg	Kontrolle cEPO	67 (57;121) 75 (68;106)	85 (51;132) 89 (59;106)	56 (39;117) 90 (62;112)
ITBV ml	Kontrolle cEPO	603 (508;888) 797 (687;1098)	645 (425;789) 772 (530;1015)	542 (351;891) 802 (517;1166)
A.ren. BF ml/min	Kontrolle cEPO	265 (38;303) 190 (153;429)	83 (70;306) 151 (55;325)	67 (37;263) 146 (95;325)
MAD mmHg	Kontrolle cEPO	90 (78;126) 93 (68;105)	82 (69;99) 84 (75;97)	72 (63;105) 85 (71;104)
ZVD mmHg	Kontrolle cEPO	11 (7;13) 12 (10;14)	11 (6;15) 13 (11;16)	12 (8;18) 14 (12;16)
NoA µg/kg	Kontrolle cEPO		627 (29;8563) 178 (21;1039)	

Tab. 3: Tabellarische Übersicht der Werte der ausgewählten Parameter für Blutgase, Säuren-Basen-Status, Elektrolyte und Temperatur. Angabe als Median (Minimum;Maximum) aller Werte. # zeigt $p < 0,05$ verglichen mit Werten vor Ballonokklusion. MZP: Messzeitpunkt; pO_2: Sauerstoffpartialdruck; pCO_2: Kohlendioxidpartialdruck; BE: base excess; Hb: Hämoglobin, Temp: Körperkerntemperatur

		vor Aortenokklusion	4 h Reperfusion	8 h Reperfusion
pO2 mmHg	Kontrolle cEPO	159 (142;206) 171 (135;231)	193 (124;248) 164 (121;246)	177 (127;243) 169 (114;246)
pCO2 mmHg	Kontrolle cEPO	37 (35;38) 36 (33;41)	36 (31;42) 36 (35;43)	36 (26;44) 36 (34;38)
pH	Kontrolle cEPO	7,44 (7,39;7,50) 7,43 (7,39;7,45)	7,04 (6,92;7,38) # 7,20 (6,95;7,33) #	6,95 (6,83;7,35) # 7,23 (6,92;7,30) #
BE mmol/l	Kontrolle cEPO	0 (-10;2) -1 (-3;2)	-18 (-24;-3) # -13 (-21;-7) #	-22 (-26;-6) # -11 (-23;-8) #
Laktat mmol/l	Kontrolle cEPO	1,8 (0,9;3,1) 2,1 (1,7;2,7)	9,2 (1,6;12,5) # 6,0 (1,1;14,6) #	9,1 (0,8;13,1) # 2,8 (0,8;14,4)
Kalium mmol/l	Kontrolle cEPO	3,3 (3,0;3,5) 3,3 (3,0;3,5)	4,1 (3,3;5,5) # 4,2 (3,8;6,1) #	5,2 (3,8;6,2) # 4,3 (3,9;6,1) #
Hb g/dl	Kontrolle cEPO	8,3 (6,8;9,1) 8,1 (7,1;8,9)	10,5 (7,6;16,2) # 11,8 (8,9;14,8) #	9,5 (7,5;18,5) 10,5 (8,7;13,5)
Temp °C	Kontrolle cEPO	33,8 (32,3;36,0) 33,7 (33,1;36,9)	32,8 (31,1;35,3) 32,4 (31,7;35,0)	33,1 (30,9;36,4) 32,3 (31,2;34,8)

In der statistischen Auswertung zeigten sich signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen nur bei der Herzfrequenz ($p = 0,011$ 4 h nach Okklusion) und dem Schlagvolumen ($p = 0,011$ 4 h nach und $p = 0,006$ 8 h nach Okklusion). Auffälllig war die Streubreite des Noradrenalinbedarfs, vor allem in der Kontrollgruppe hatten manche Tiere um den Faktor 10 bis 20 höheren Katecholaminbedarf. Das wiederum hatte Auswirkung auf die Herzfrequenz und bei hohen Frequenzen auf das kardiale Schlagvolumen.

3.2. Nierenfunktion

Die Nierenfunktion wurde mit Hilfe der Kreatininclearance, Kreatinin im Plasma und der fraktionelle Natriumexkretion abgebildet. Zusätzlich wurde noch das Neutrophilen Gelatinase-assoziiertes Lipocalin (NGAL), ein neuartiger Marker der Nierenfunktion, betrachtet. Die Kreatininclearance fällt bei bereits kleinen Funktionseinbußen der glomerulären Filtrationsleistung ab, eine vermehrte Natriumexkretion im Urin findet sich bei tubulären Schädigungen und NGAL steigt spezifisch bei Schädigungen der Niere sehr rasch und deutlich an und bildet Funktionseinbußen sowohl des glomerulären Filtrationsapparates wie des reabsorptiven Tubulusepithels ab [55].

Die Abbildungen 9 bis 13 zeigen die ermittelten Werte.

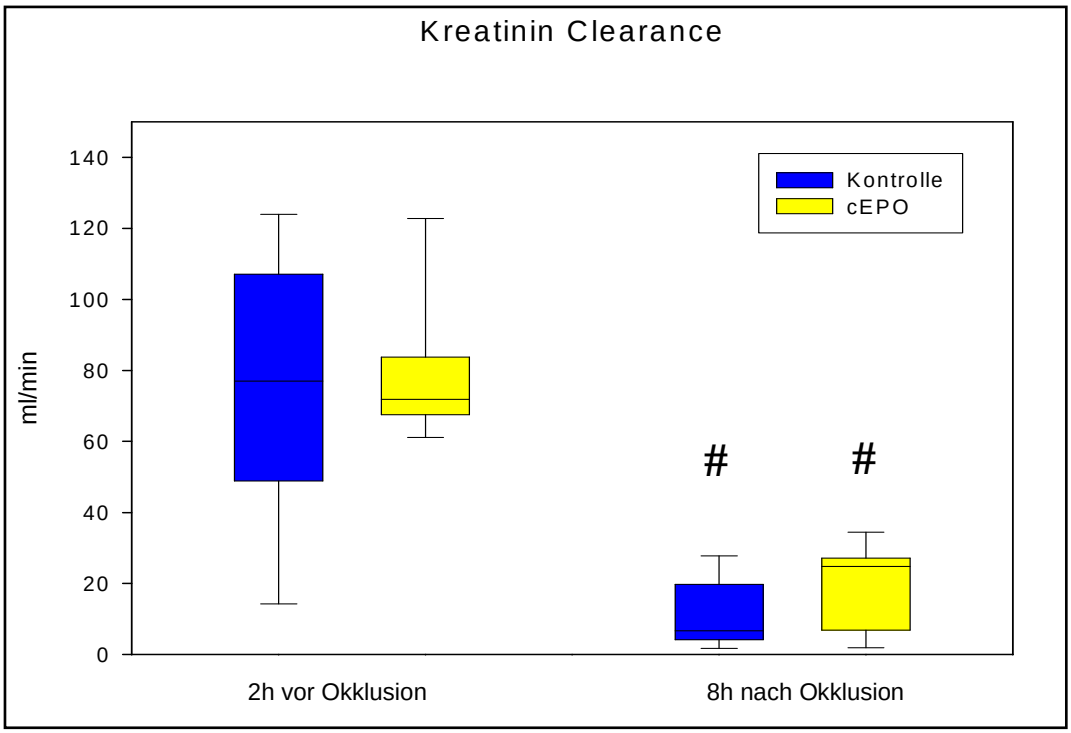

Abb. 9: Kreatininclearance in ml/min. Signifikanter Abfall 8h nach Okklusion in beiden Gruppen (#, p=0,001 Kontrolle, p=0,016 cEPO). Kein Unterschied zw. den Gruppen. Darstellung als Boxplot mit Median, erster und letzter Quartile, Minima und Maxima.

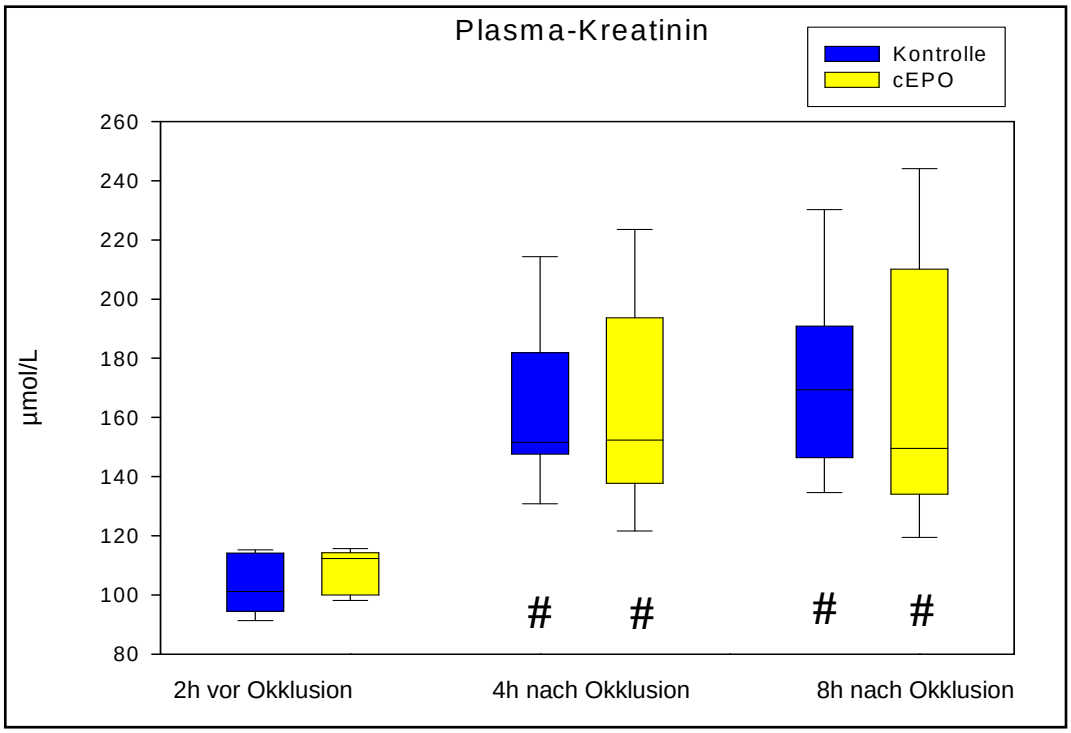

Abb. 10: Plasmakreatininwert in µmol/l. Signifikanter Anstieg 4h und 8h nach Okklusion bezogen auf dem Zeitpunkt vor Okklusion in beiden Gruppen (#, p=0,001 für alle Werte). Kein Unterschied zw. den Gruppen. Darstellung als Boxplot mit Median, erster und letzter Quartile, Minima und Maxima.

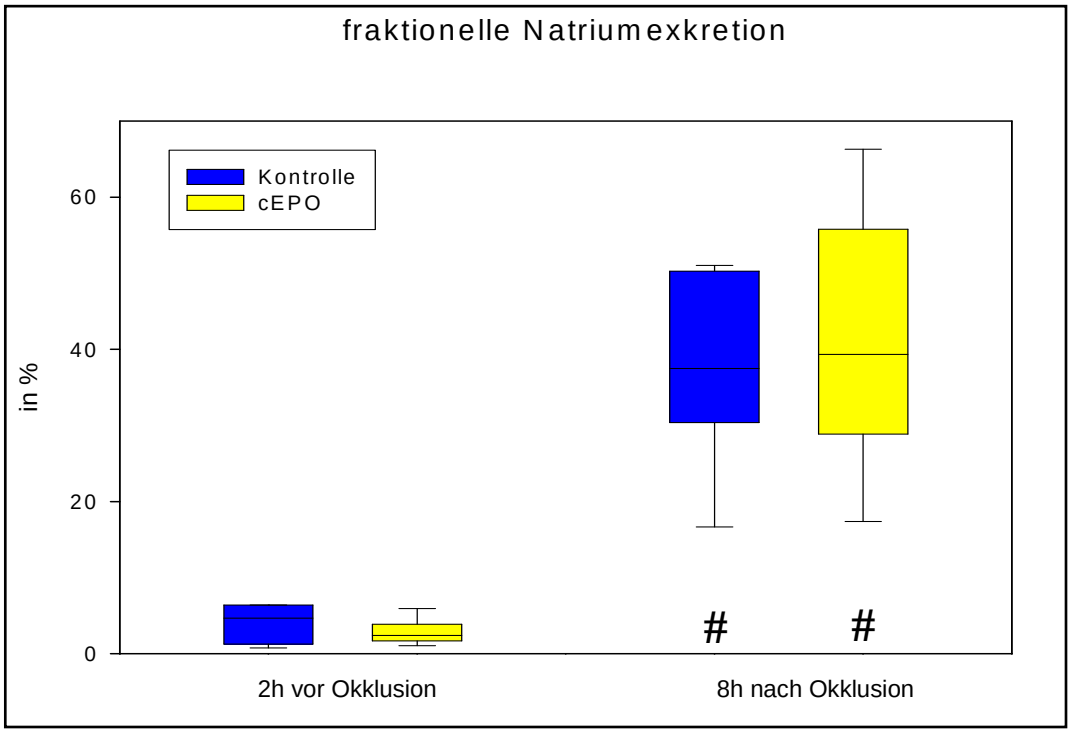

Abb. 11: Fraktionelle Natriumexkretion in %. Signifikanter Anstieg in beiden Gruppen (#, p = 0,001 für beiden Gruppen). Kein Unterschied zw. den Gruppen. Darstellung als Boxplot mit Median, erster und letzter Quartile, Minima und Maxima.

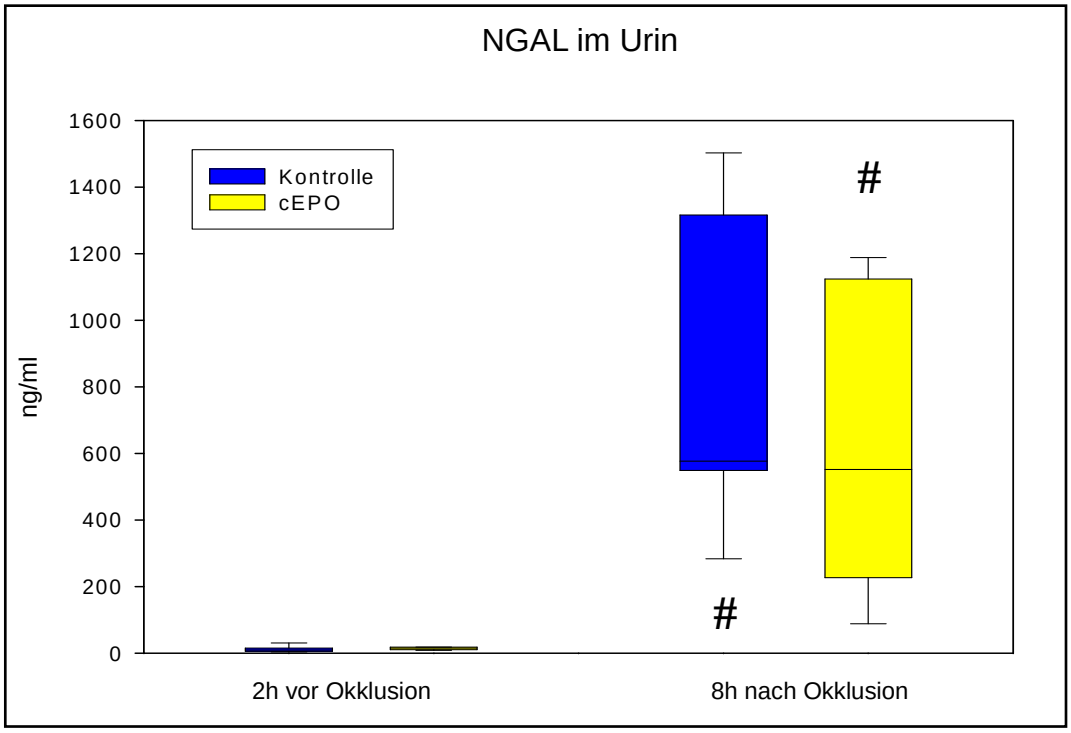

Abb. 12: Neutrophilen Gelatinase-assoziiertes Lipocalin (NGAL) im Urin in ng/ml. Signifikanter Anstieg in beiden Gruppen (#, p < 0,001 für beide Gruppen), kein signifikanter Unterschied zw. den Gruppen. Darstellung als Box-Plot mit Median, erster und letzter Quartile, Minima und Maxima.

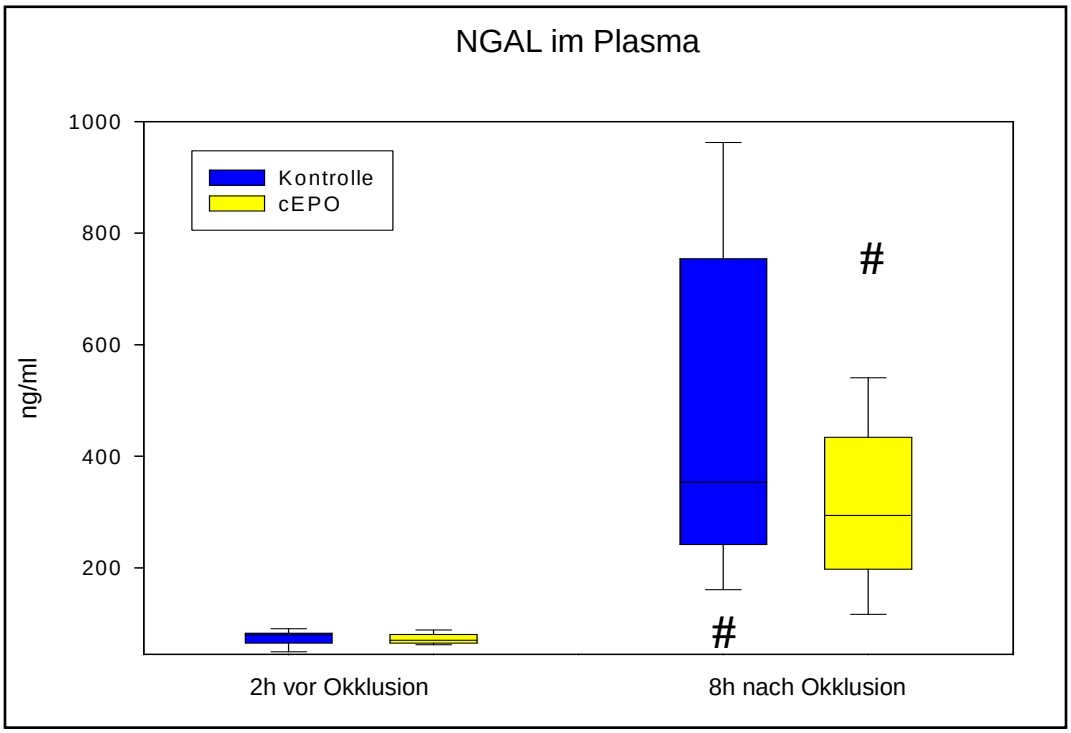

Abb. 13: Neutrophilen Gelatinase-assoziiertes Lipocalin (NGAL) im Plasma in ng/ml. Signifikanter Anstieg in beiden Gruppen (#, $p < 0{,}001$ für beide Gruppen), kein signifikanter Unterschied zw. den Gruppen. Darstellung als Box-Plot mit Median, erster und letzter Quartile, Minima und Maxima.

Die Kreatininclearance belief sich 2 h vor Okklusion im Mittel auf 76 ml/min in der Kontrollgruppe und auf 115 ml/min in der cEPO Gruppe und sank zum Versuchsende im Mittel auf 12 und 19 ml/min, respektive. Das bedeutete einen signifikanten Abfall auf etwa 20% des Ausgangswertes (Kontrolle $p = 0{,}001$, cEPO $p = 0{,}016$). Zwischen den Gruppen ergaben sich jedoch keine signifikanten Unterschiede.

Der Plasmakreatininwert lag 2 h vor Okklusion bei 103 µmol/l (Mittelwert Kontrolle) und 108 µmol/l (Mittelwert cEPO) und ist in beiden Gruppen nach Okklusion signifikant angestiegen (4 h nach Okklusion 163 und 162 µmol/l, 8 h nach Okklusion 171 und 166 µmol/l, respektive, mit $p = 0{,}001$ für alle Werte). Auch hier ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen.

Die fraktionelle Natriumexkretion lag 2 h vor der Okklusion im Mittel bei 4% (Kontrolle) und 3% (cEPO) und erreichte zum Ende des Versuchs im Mittel 39% (Kontrolle) und 41% (cEPO), was einen signifikanten Anstieg des Natriums im Urin in beiden Gruppen bedeutet ($p = 0{,}001$ für beide Werte). Zwischen den Gruppen gab es jedoch keinen signifikanten Unterschied.

NGAL im Urin lag 2 h vor Okklusion in der Kontrollgruppe im Mittel bei 13 ng/ml, in der

cEPO Gruppe bei 14 ng/ml, stieg dann 8h nach Okklusion in beiden Gruppen um etwa den Faktor 50 signifikant auf 754 ng/ml in der Kontrollgruppe und 639 ng/ml in der cEPO Gruppe ($p < 0{,}001$ für beide Gruppen) an. Es zeigte sich jedoch kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen. Ähnlich verhielt sich der Verlauf von NGAL im Plasma: 2 h vor Okklusion lag der Wert in beiden Gruppen bei 73 ng/ml, stieg dann 8 h nach Okklusion um etwa den Faktor 5 signifikant auf 430 ng/ml in der Kontrollgruppe und auf 312 ng/ml in der cEPO Gruppe ($p < 0{,}001$ für beide Gruppen) an. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen.

3.3 Systemische Stressantwort

Auf globaler Ebene wurden die beiden Entzündungsmarker TNF α und IL-6, Nitrat/Nitrit, ein Marker für nitrosativen, und 8-Isoprostane, ein Marker für oxidativen Stress untersucht. Im Comet Assay wurde eine mögliche Zunahme von Strangbrüchen der DNA-haltigen Blutzellen evaluiert. Die Abbildungen 14 bis 18 zeigen die Ergebnisse.

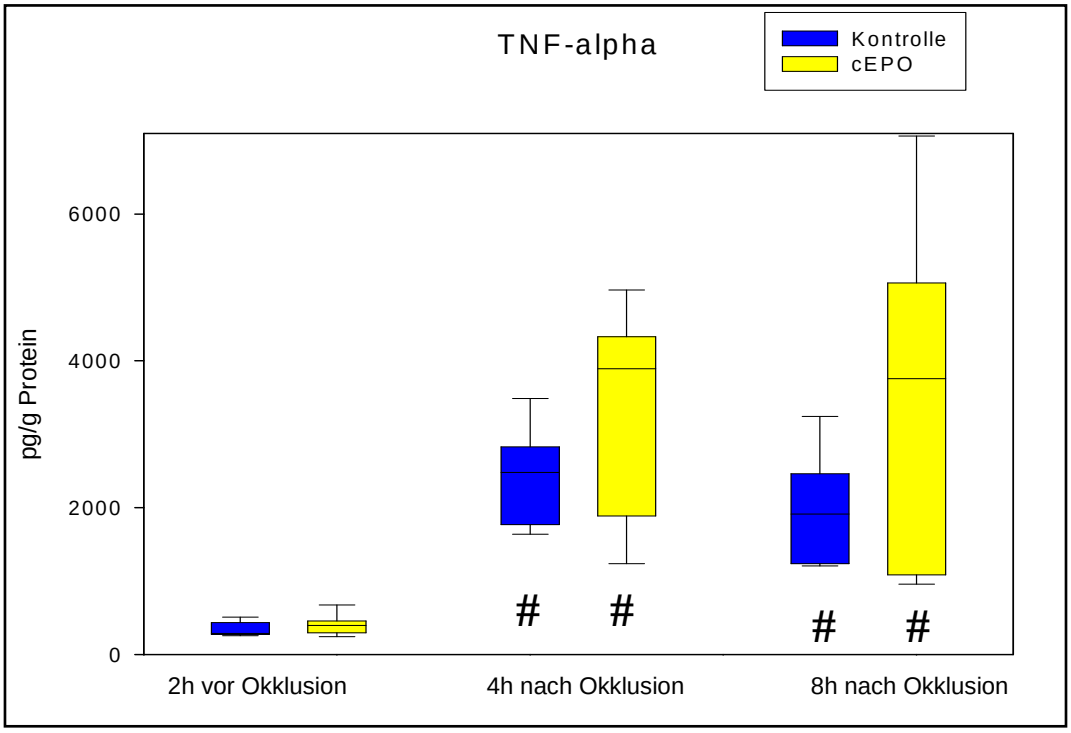

Abb. 14: Tumornekrosefaktor α (TNF α) in pg/g Plasmaprotein. Signifikanter Anstieg in beiden Gruppen 4h und 8h nach Okklusion bezogen auf den Zeitpunkt vor Okklusion (#, $p < 0{,}05$ Kontrolle, $p < 0{,}001$ cEPO). Kein signifikanter Unterschied zw. den Gruppen. Darstellung als Box-Plot mit Median, erster und letzter Quartile, Minima und Maxima.

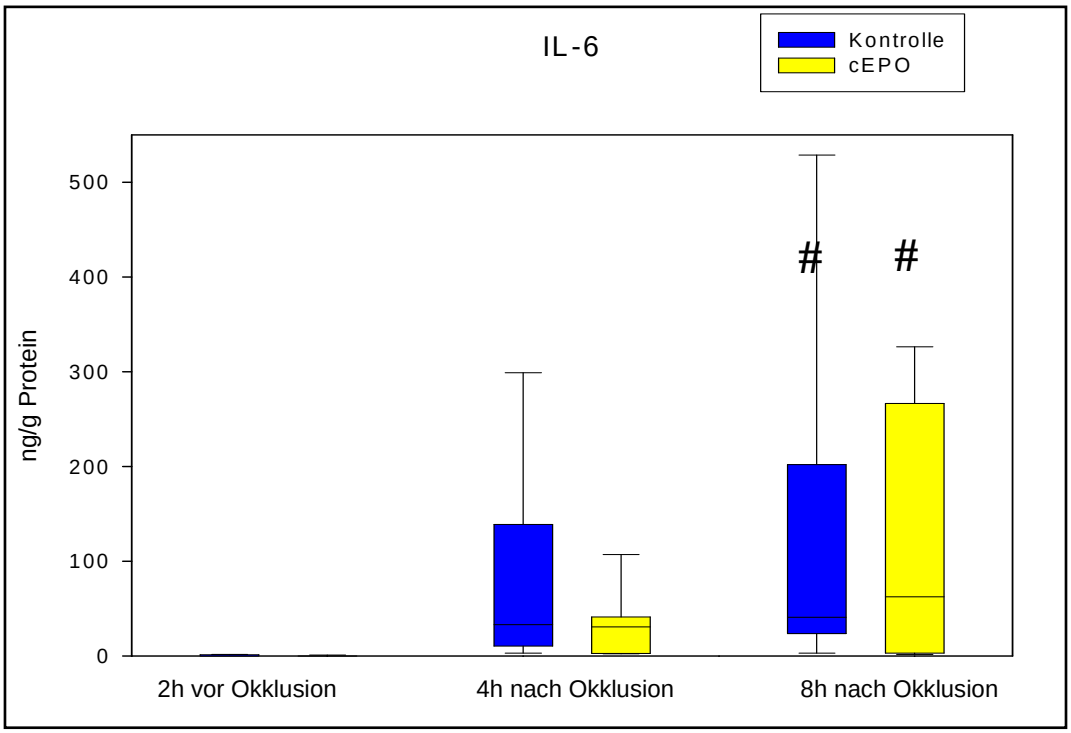

Abb. 15: Interleukin 6 (IL 6) in ng/g Plasmaprotein. Signifikanter Anstieg in beiden Gruppen 8h nach Okklusion bezogen auf den Zeitpunkt vor Okklusion (#, $p < 0,05$ Kontrolle, $p = 0,014$ cEPO). Kein signifikanter Unterschied zw. den Gruppen. Darstellung als Box-Plot mit Median, erster und letzter Quartile, Minima und Maxima.

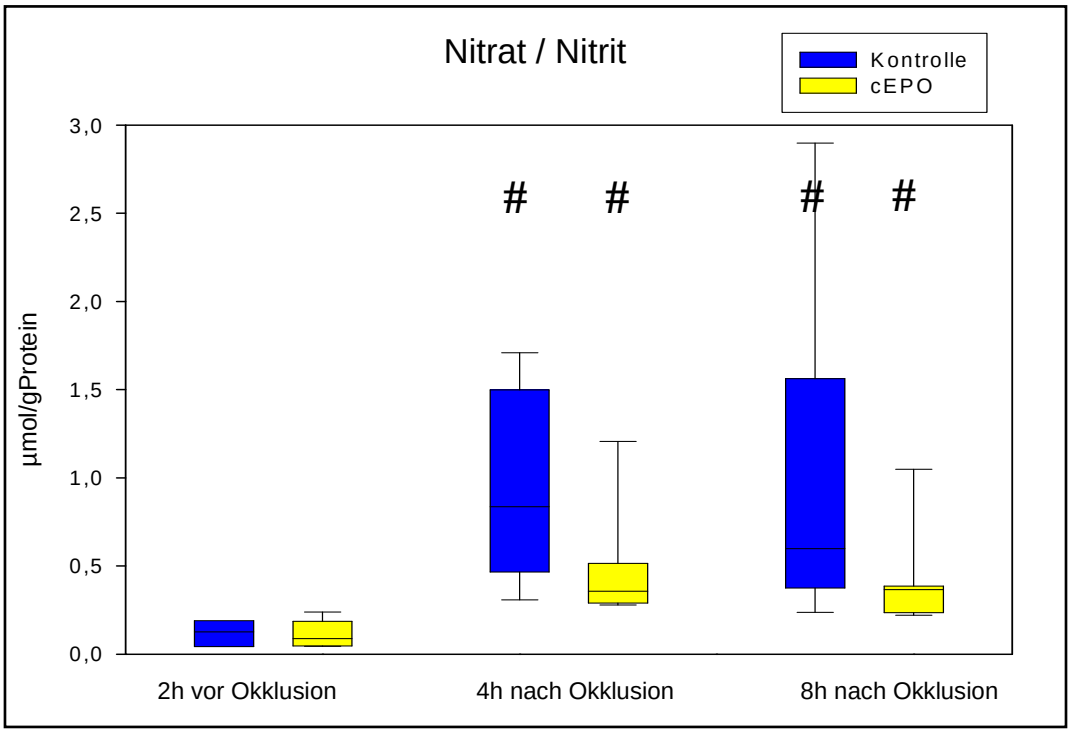

Abb. 16: Nitrat/Nitrit in µmol/g Plasmaprotein. Signifikanter Anstieg in beiden Gruppen 4h und 8h nach Okklusion bezogen auf den Zeitpunkt vor Okklusion. (#, $p < 0,05$). Kein signifikanter Unterschied zw. den Gruppen. Darstellung als Box-Plot mit Median, erster und letzter Quartile, Minima und Maxima.

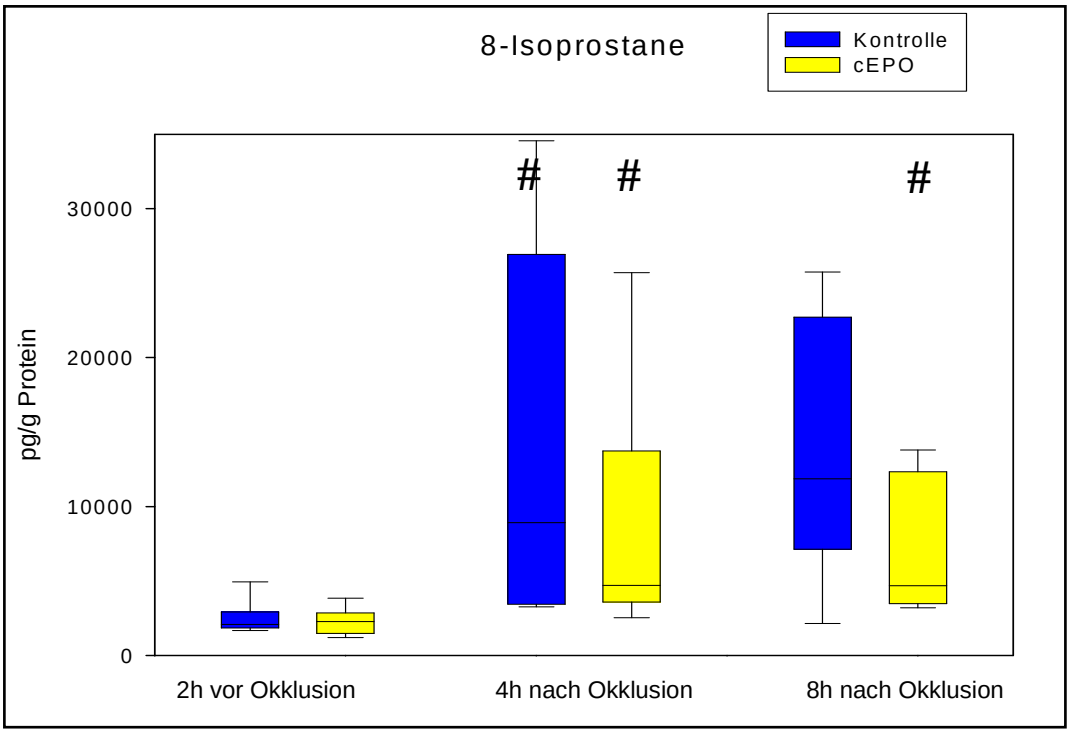

Abb. 17: 8-Isoprostane in pg/g Plasmaprotein. Signifikanter Anstieg 4h nach Okklusion in beiden Gruppen bezogen auf den Zeitpunkt vor Okklusion (#, $p < 0,05$ Kontrolle, $p = 0,017$ cEPO). Kein signifikanter Unterschied zw. den Gruppen. Darstellung als Box-Plot mit Median, erster und letzter Quartile, Minima und Maxima.

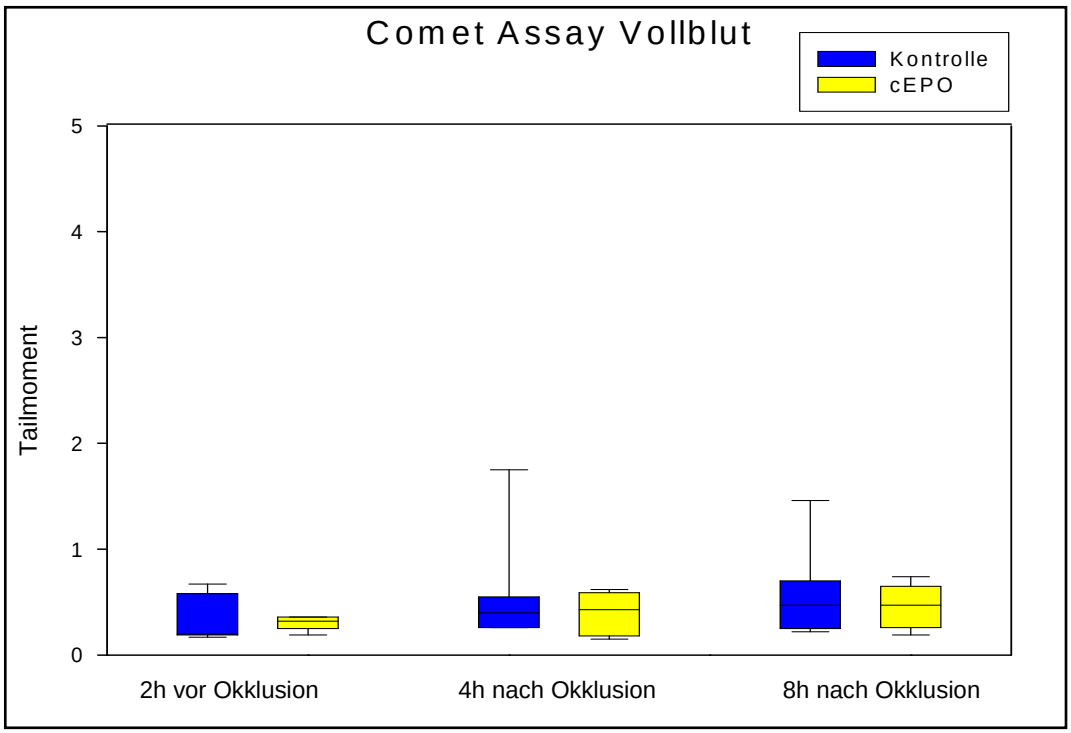

Abb. 18: DNA-Strangbrüche im Vollblut, detektiert im Comet Assay. Angabe als Tailmoment. Keine signifikante Änderung innerhalb oder zwischen den Gruppen. Darstellung als Box-Plot mit Median, erster und letzter Quartile, Minima und Maxima.

Der Ausgangswert für TNFα betrug im Mittel 0,42 ng/g Protein in der Kontrollgruppe und 0,40 ng/g Protein in der cEPO Gruppe. Während des Versuches kam es zum signifikanten Anstieg in beiden Gruppen (4 h nach Okklusion 2,45 und 3,41 ng/g Protein, 8 h nach Okklusion 2,20 und 3,41 ng/g Protein mit $p < 0,05$ und $p < 0,001$, respektive).

Der Ausgangswert für IL-6 lag im Mittel unter der Nachweisgrenze und stieg ähnlich wie TNF α an, signifikant wurde er 8 h nach Okklusion (77,98 und 32,24 ng/g Protein 4 h nach Okklusion, 121,26 und 108,38 ng/g Protein 8 h nach Okklusion mit $p < 0,05$ und $p = 0,014$, respektive).

Die Ausgangswerte für Nitrat/Nitrit betrugen im Mittel 0,7 µmol/g Protein in der Kontrollgruppe und 0,1 µmol/g Protein in der cEPO Gruppe, stiegen dann in beiden Gruppen während des Versuches sukzessive signifikant an (4 h nach Okklusion auf 0,9 und 0,5 µmol/g Protein, 8 h nach Okklusion auf 1,0 und 0,4 µmol/g Protein an, respektive, mit $p < 0,05$). Auch hier zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen.

Die Bestimmung von 8-Isoprostanen ergab 2 h vor Okklusion in der Kontrollgruppe im Mittel einen Wert von 2,71 ng/g Protein, in der cEPO Gruppe 2,30 ng/g Protein. In beiden Gruppen kam es zu einem signifikanten Anstieg nach Okklusion (17,73 ng/g und 8,78 ng/g Protein, 8 h nach Okklusion 14,29 ng/g und 6,85 ng/g Protein, mit $p < 0,05$ und $p = 0,017$, respektive). Der Unterschied zwischen den Gruppen war jedoch nicht statistisch signifikant.

Im Comet Assay aus Vollblut konnten zu keinem der Messzeitpunkte vermehrt DNA-Strangbrüche detektiert werden.

3.4 Stressantwort der Niere

Carbamyliertes EPO soll antiinflammatorische und zytoprotektive Effekte aufweisen. Deshalb wurden die oben beschriebenen systemischen Marker gewählt. Auf Organebene wurde die Bildung von Nitrotyrosin, einen Protein, der bei vermehrten oxidativen und nitrosativen Stress entsteht, daneben iNOS als wichtigen Quelle für Stickoxidradikale, und HO-1 als ein wichtiger protektiven Faktor bei oxidativen Stress untersucht. Ein erhöhtes Vorkommen von Sauerstoffradikalen und damit vermehrte DNA-Schädigung wurde mit Hilfe des Comet Assays der Niere evaluiert. Auch der nukleäre Transkriptionsfaktor NF-κB und sein zytoplasmatischer Inhibitor IκBa, sowie der wichtige EPO- und HO-1-Regulator HIF-1α wurden ausgewertet. Abbildungen 19 bis 25 zeigen die Ergebnisse.

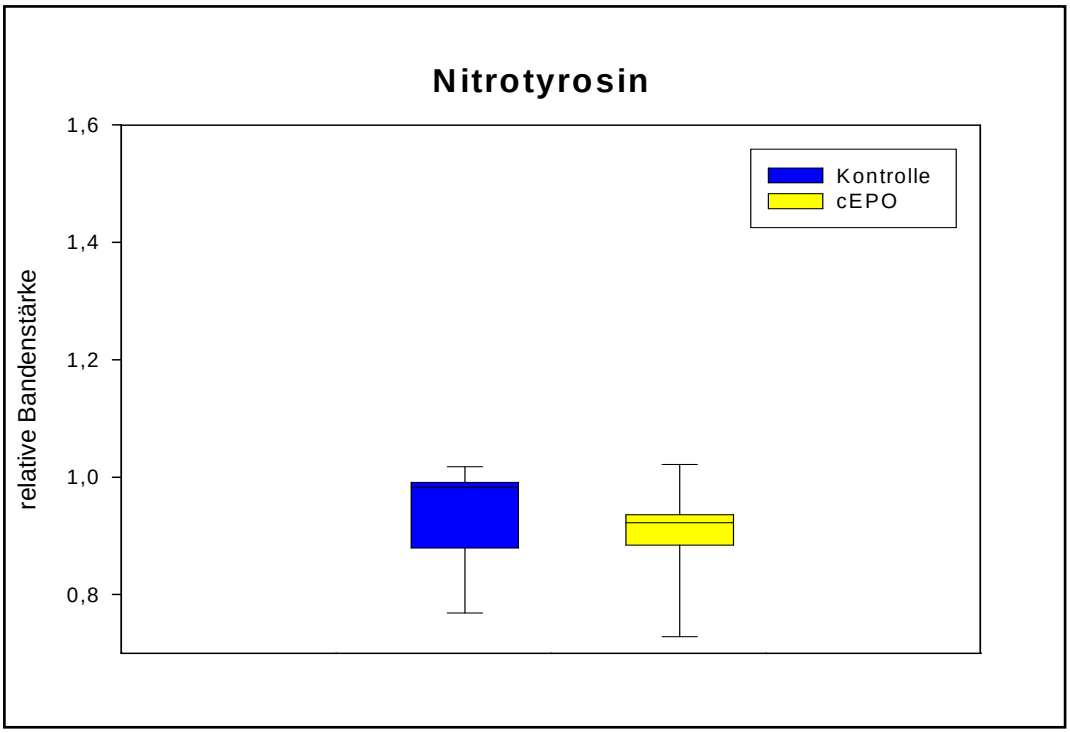

Abb. 19: Nitrotyrosin angegeben als relative Bandenintensität im Western Blot. Kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen. Darstellung als Box-Plot mit Median, erster und letzter Quartile, Minima und Maxima.

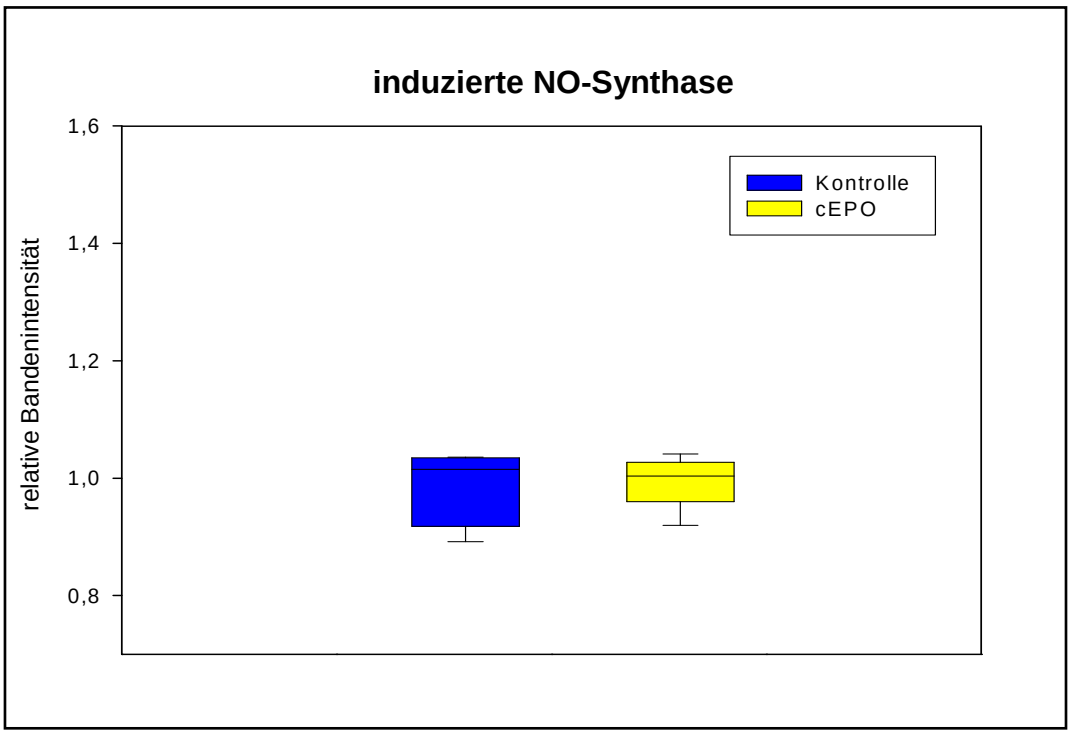

Abb. 20: Induzierte NO-Synthase (iNOS) angegeben als relative Bandenintensität im Western Blot. Kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen. Darstellung als Box-Plot mit Median, erster und letzter Quartile, Minima und Maxima.

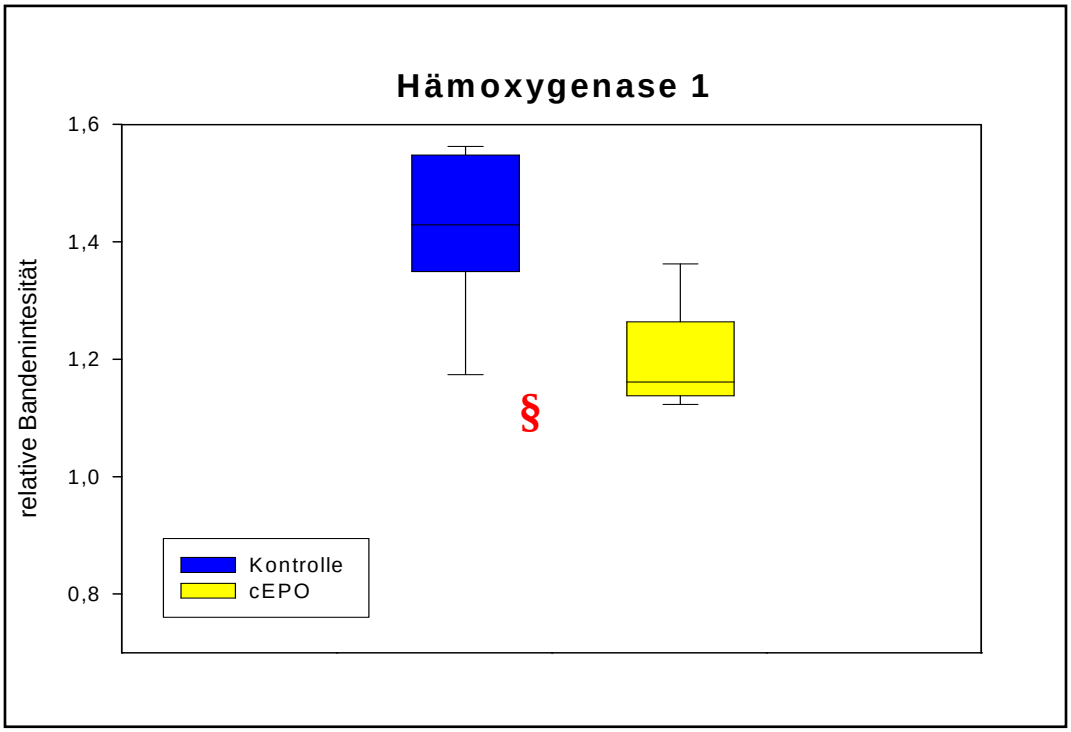

Abb. 21: Hämoxygenase-1 (HO-1) angegeben als relative Bandenintensität im Western Blot. Signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen (§, p = 0,012). Darstellung als Box-Plot mit Median, erster und letzter Quartile, Minima und Maxima.

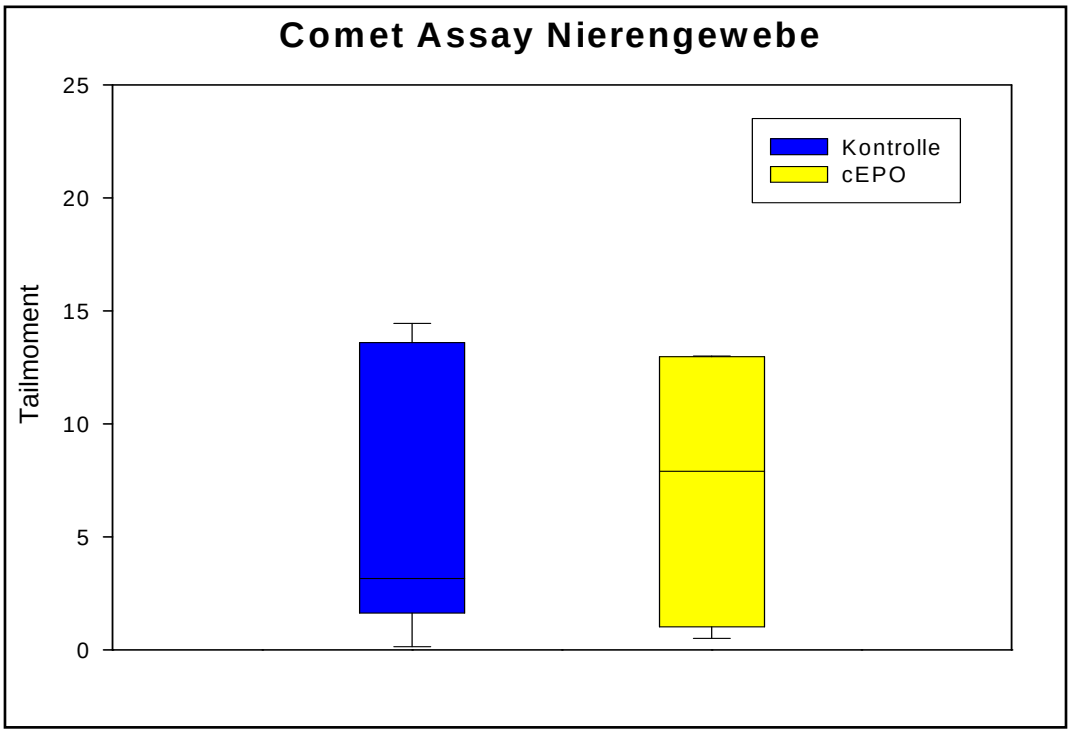

Abb. 22: DNA-Strangbrüche im Nierengewebe, detektiert im Comet Assay. Angabe als Tailmoment. Keine signifikante Änderung zwischen den Gruppen. Darstellung als Box-Plot mit Median, erster und letzter Quartile, Minima und Maxima.

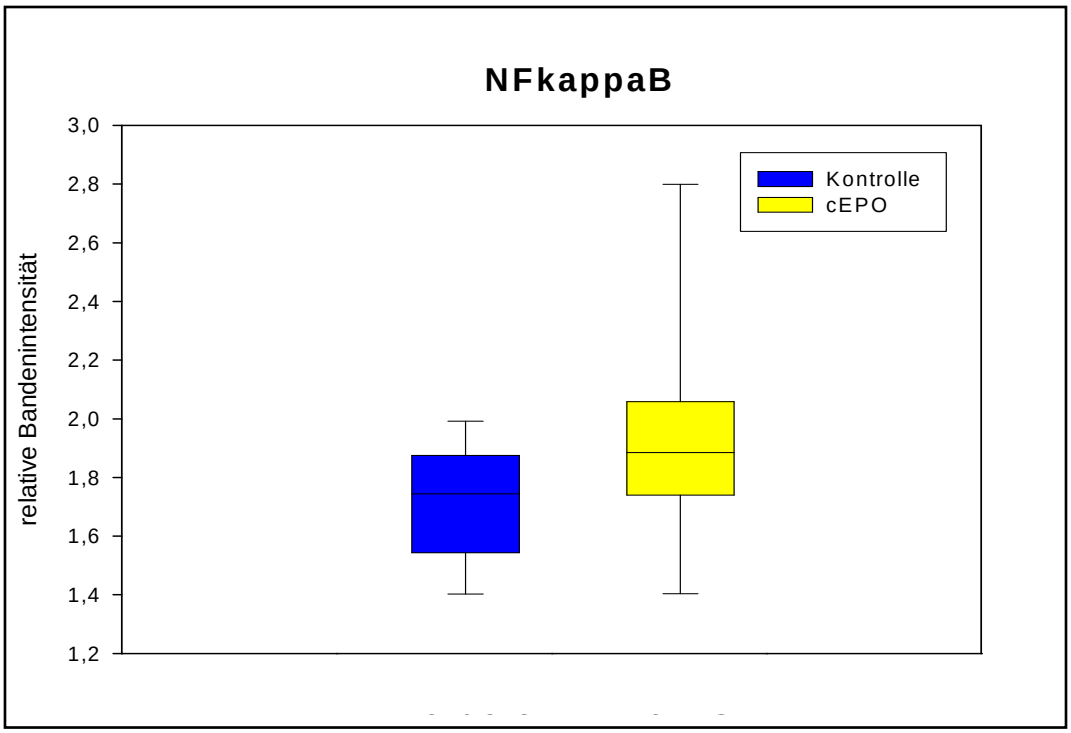

Abb. 23: Nuclear Factor kappa-light-chain-enchancer of activated B cells (NF-κB) angegeben als relative Bandenintensität im Electrophoretic Mobility Shift Assay. Kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen. Darstellung als Box-Plot mit Median, erster und letzter Quartile, Minima und Maxima.

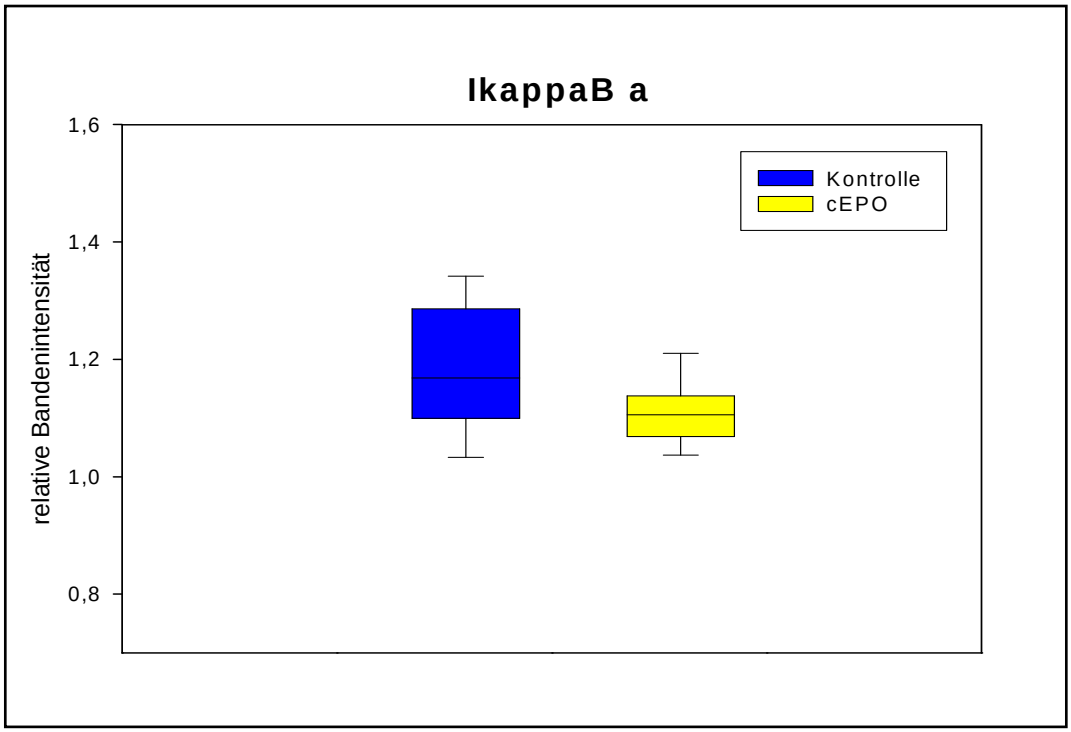

Abb. 24: Inhibitor of NF-κB a (IκBa) angegeben als relative Bandenintensität im Western Blot. Kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen. Darstellung als Box-Plot mit Median, erster und letzter Quartile, Minima und Maxima.

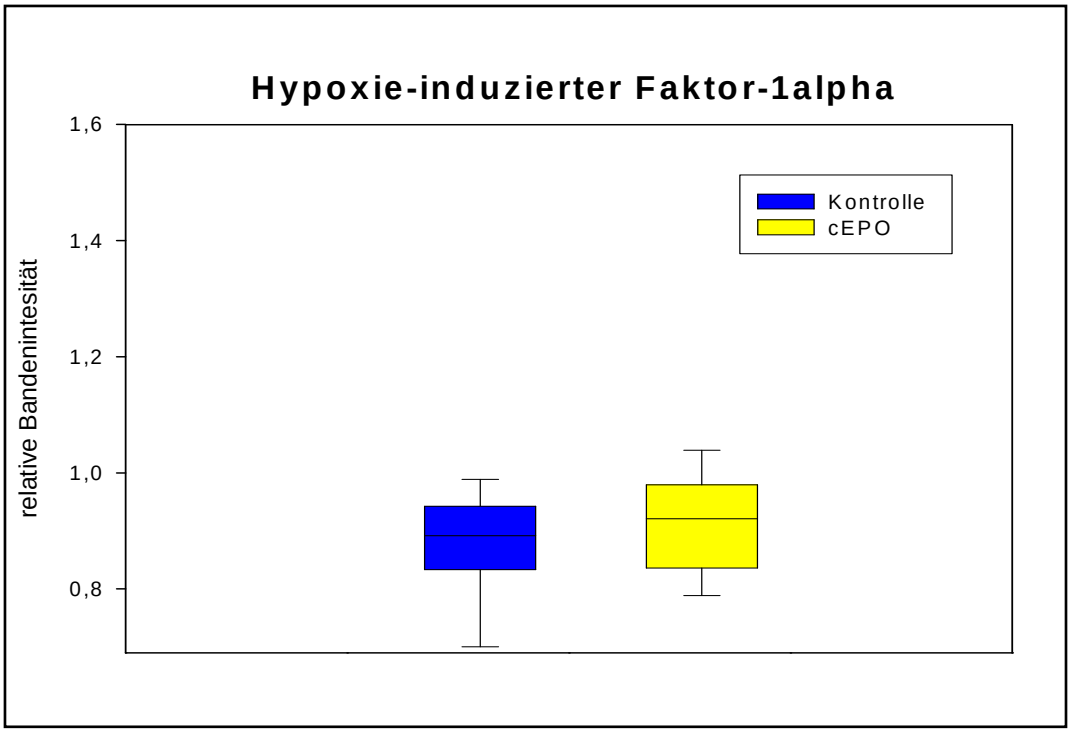

Abb. 25: Hypoxie-induzierter Faktor-1α (HIF-1α) angegeben als relative Bandenintensität im Western Blot. Kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen. Darstellung als Box-Plot mit Median, erster und letzter Quartile, Minima und Maxima.

Alle erwähnten Parameter zeigten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen 8 h nach Okklusion, die einzige Ausnahme fand sich bei HO-1 ($p = 0{,}012$).

Die Auswertung der Nierenbiopsie 2 h vor Okklusion im Comet Assay musste aufgrund ihrer außerordentlichen Inhomogenität und Implausibilität der Ergebnisse (scheinbar größere DNA-Schädigung als nach Okklusion) komplett verworfen werden.

3.5 Apoptose

Ein besonderes Augenmerk wurde aufgrund der vermuteten antiapoptotischen Wirkung von cEPO auf die Regulierung des selbstinduzierten Zelltodes gelegt.

Im Western Blot wurde die antiapoptotischen Effektormoleküle XIAP und Bcl-XL untersucht, außerdem die Effektorcaspase 3, die als aktivierte cleaved Caspase 3 eine bereits fortgeschrittene Apoptose abbildet. Im diesen Zusammenhang muss auch der bereits erwähnter NF-κB betrachtet werden. Die Abbildungen 26 bis 28 zeigen die Ergebnisse.

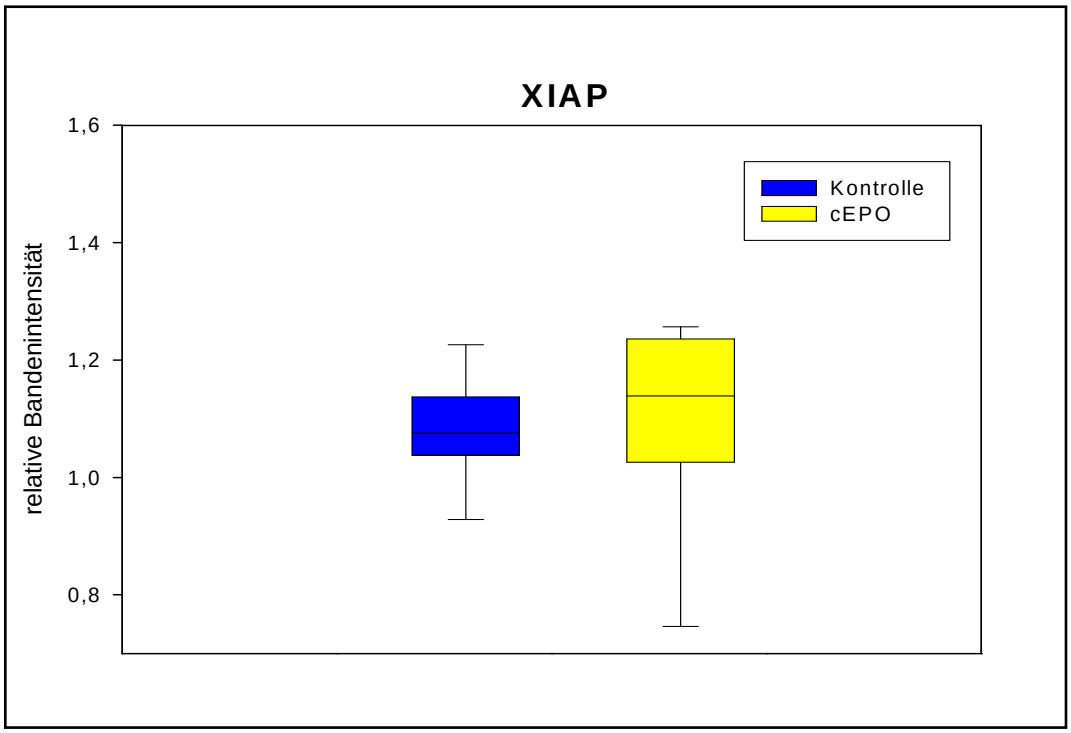

Abb. 26: X-linked inhibitor of apoptosis protein (XIAP) angegeben als relative Bandenintensität im Western Blot. Kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen. Darstellung als Box-Plot mit Median, erster und letzter Quartile, Minima und Maxima.

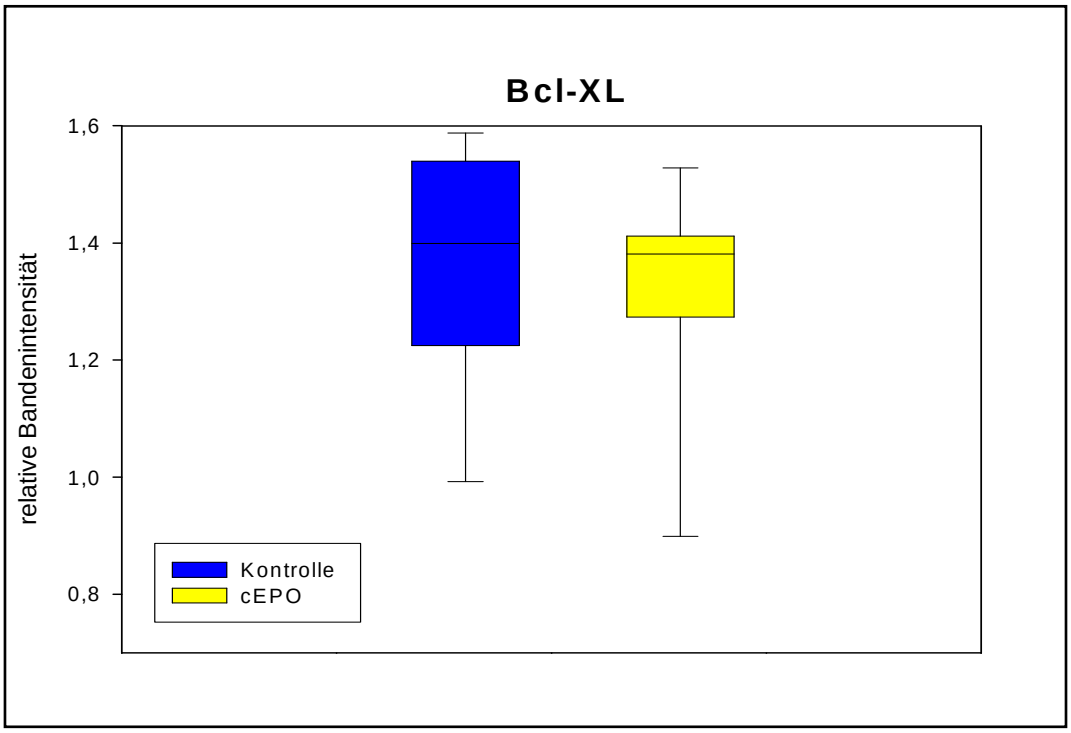

Abb. 27: B-cell lymphoma extra large (Bcl-XL) angegeben als relative Bandenintensität im Western Blot. Kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen. Darstellung als Box-Plot mit Median, erster und letzter Quartile, Minima und Maxima.

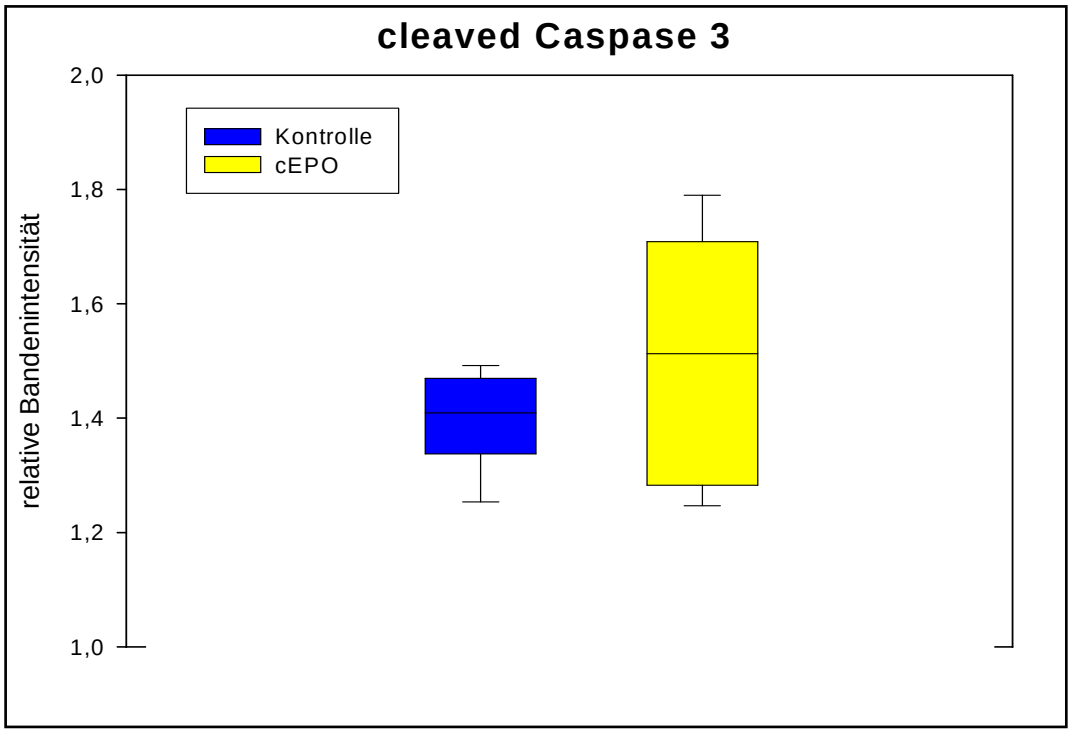

Abb. 28: Cleaved Caspase 3 angegeben als relative Bandenintensität im Western Blot. Kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen. Darstellung als Box-Plot mit Median, erster und letzter Quartile, Minima und Maxima.

Sowohl die antiapoptotischen Marker XIAP und Bcl-XL wie auch die proapoptotische cleaved (aktivierte) Caspase 3 zeigten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen 8 h nach Okklusion.

3.6 EPO-Rezeptor

In der immunhistochemischen Untersuchung wurden Stichproben von Nierenbiopsien auf eventuelle Unterschiede in der EPO-R Expression untersucht. Hierbei wurden ausnahmsweise vier Proben von jungen gesunden deutschen Landschweinen und fünf Proben der FBM Rasse vor einer Aortenokklusion miteinander verglichen. Das Ergebnis zeigt um ein Vielfaches höhere Rotfärbung, ergo EPO-R Expression, in Nieren der gesunden Jungtiere, die FBM Rasse zeigt bereits vor einer Ischämie/Reperfusion eine deutlich verminderte oder mangelnde EPO-R Nachweisbarkeit. Abbildungen 29 und 30 zeigen die Ergebnisse.

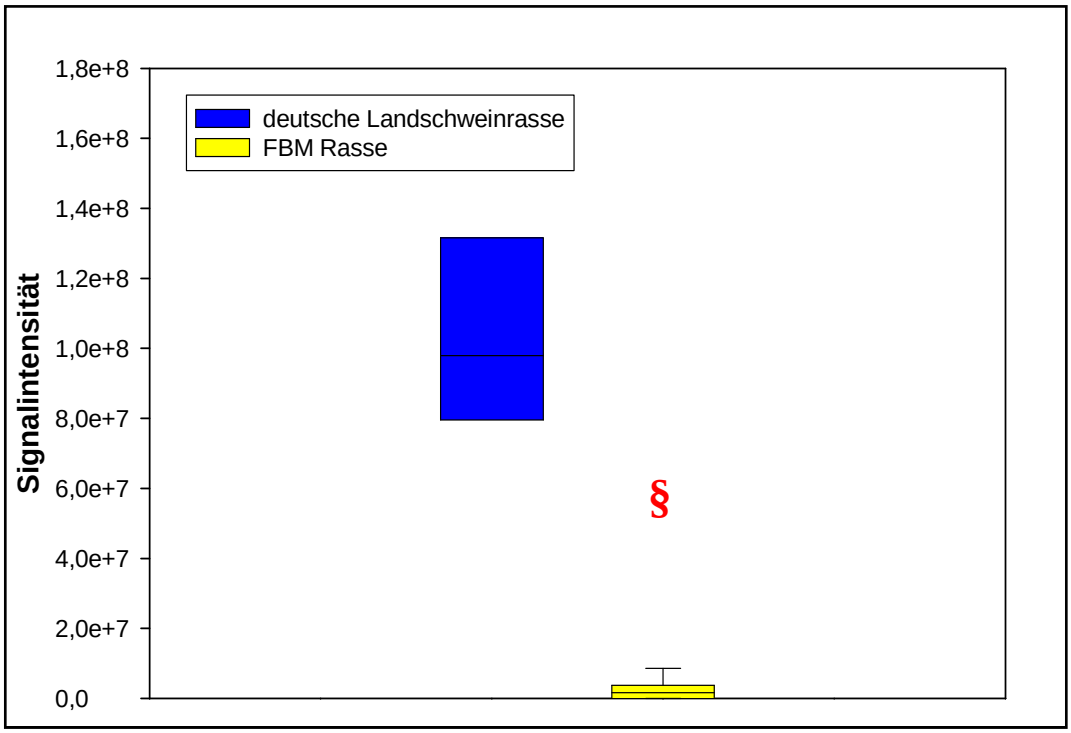

Abb. 29: Erythropoetin-Rezeptor Expression angegeben als exponentielle Summensignalintensität der Rotfärbung. Signifikanter Unterschied zwischen der deutschen Landschwein- und der FBM-Gruppe mit Hypercholesterinämie (§, $p < 0{,}010$). Darstellung als Box-Plot mit Median, erster und letzter Quartile, Minima und Maxima.

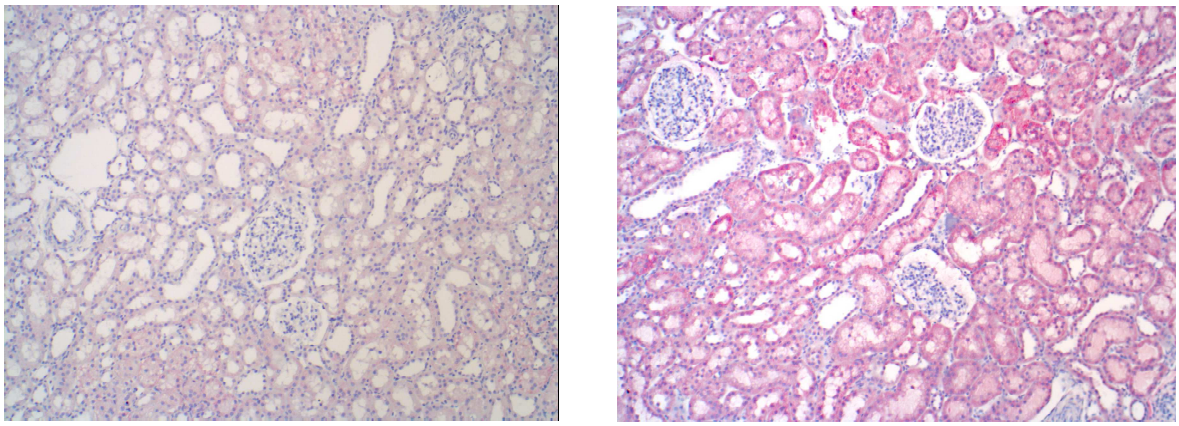

Abb. 30: Zwei Beispielbilder zur Erythropoetin-Rezeptor (EPO-R) Expression nach Durchführung der beschriebenen Immunhistochemie. Links ein Nierenpräparat der FBM Rasse mit Hypercholesterinämie, rechts ein Präparat der jungen, gesunden deutschen Landschweinrasse, die Rotfärbung zeigt die regionale Verteilung des Erythropoetin-Rezeptors an.

3.7 Nierenmorphologie

Durch zytoprotektive, antiapoptotische und antiinflammatorische Eigenschaften sollte cEPO Integrität und Morphologie der Niere besser erhalten. Dieser Aspekt wurde untersucht, indem alle Nierenproben der PAS-Reaktion unterzogen und bezüglich

glomerulären und tubulären Veränderungen ausgewertet wurden. Der Untersucher war während der Auswertung für die Gruppenzugehörigkeit verblindet. Die folgenden Schädigungssmuster orientieren sich an in Heptinstall's Pathology of the Kidney [73] beschriebenen akuten ischämischen Veränderungen der Niere.

3.7.1 Glomerula

Aus dem Präparat N0 (Nierenbiopsie vor Okklusion) wurden 30 repräsentative Glomerula ausgewählt. Aus dem Präparat N1 (Nierenprobe 8 h nach Okklusion) wurden 30 repräsentative Glomerula aus dem Cortex (als Cortex bezeichnet) und 30 repräsentative Glomerula aus der juxtamedullären Region (als Medulla bezeichnet) ausgewählt. Alle Glomerula wurden nach folgenden Aspekten ausgewertet:

1.1 Dilatation des Bowmanschen Kapselraumes

1.2 glomeruläre Tubularisation

1.3 ödematöse Verdickung des parietalen Epithels der Bowmanschen Kapsel

Diese Aspekte wurden ausgezählt und als absolute Zahl (x von 30) und in % für N0, N1 Cortex und N1 Medulla, wie auch als absolute Zahl (x von 60) und in % für N1 gesamt angegeben.

3.7.2 Tubuli

Aus dem Präparat N0 (Nierenbiopsie vor Okklusion) wurden 3 repräsentative Bilder bei 100facher Vergrößerung ausgewählt und fotografiert. Aus dem Präparat N1 (Nierenprobe 8 h nach Okklusion) wurden 3 repräsentative Bilder aus dem Cortex (Bilder 1-3) und 3 repräsentative Bilder aus der juxtamedullären und medullären Region (Bilder 4-6) bei derselben Vergrößerung ausgewählt und fotografiert. Jedes Bild wurde in 4 Quadranten aufgeteilt und jeden Quadranten die maximale der folgenden Ausprägungen zugewiesen:

2.1 zytoplasmatische Ödem:

1 = kein Ödem

2 = einzelne Zellen betroffen

3 = Gruppen von Zellen betroffen

4 = Zellödem mit Abhebung der Epithelzellen von der Basalmembran

2.2 Zellverlust der Tubuli

1 = intakte Tubuli

2 = einzelne fehlende Zellen

3 = fehlende Gruppen von Zellen

4 = Untergang kompletter Tubuli = Nekrose

2.3 Dilatation der Lumina und Verschmälerung des Tubulusepithels

1 = normal weite Tubuluslumina mit normalen Epithel

2 = einzelne Tubuli betroffen

3 = etwa die Hälfte aller Tubuli in einem Quadranten betroffen

4 = nahezu alle Tubuli in einem Quadranten betroffen

Aus den Werten aller Quadranten eines Bildes wurde der Mittelwert gebildet. Es ergab sich so ein fließender Übergang zwischen keiner Schädigung (1) und maximaler Schädigung (4) pro Bild. Die Werte wurden als absolute Zahlen in eine Excel-Tabelle übertragen.

Pro Merkmal wurden somit jeweils 3 Werte für N0 (N0 1-3), N1 Cortex (N1 1-3) und N1 Medulla (N1 4-6), und 6 Werte für N1 gesamt (N1 1-6) ermittelt.

Die absoluten Zahlen aus der Auswertung der Glomerula und der Tubuli wurden für weitere statistische Berechnungen verwendet. Es wurden zuerst nur die kortikalen Anteile der beiden Proben miteinander verglichen, da die Probe vor Okklusion nur die kortikale Region beinhaltete. Damit sollte eine gute Vergleichbarkeit zwischen den Proben vor und nach I/R gewährleistet sein. Anschließend wurde die Probe 8 h nach Okklusion in sich verglichen: nur kortikale Anteile, nur medulläre Anteile und als ein Gesamtes, um eine eventuelle regionalen Häufung von bestimmten Schädigungsmuster zu entdecken. Es wurde jeweils ein Merkmal untersucht, die Kontrollgruppe der cEPO Gruppe gegenüber gestellt. Das sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen zeigten und die einzelnen Merkmale unterschiedlich schwerwiegende Auswirkungen auf die Integrität der Niere bedeuten, erschien es nicht sinnvoll, die Merkmale noch weiter zusammen zu fassen.

Die Abbildungen 31 bis 60 zeigen die Ergebnisse. Zuerst werden auf den nächsten Seiten zu jedem Schädigungsmuster ausgewählte bei 100facher Vergrößerung fotografierte Beispielbilder gezeigt. Anschließend wird die zugehörige grafische Darstellung als Box-Plot präsentiert.

zu 1.1 Dilatation des Bowmanschen Kapselraumes

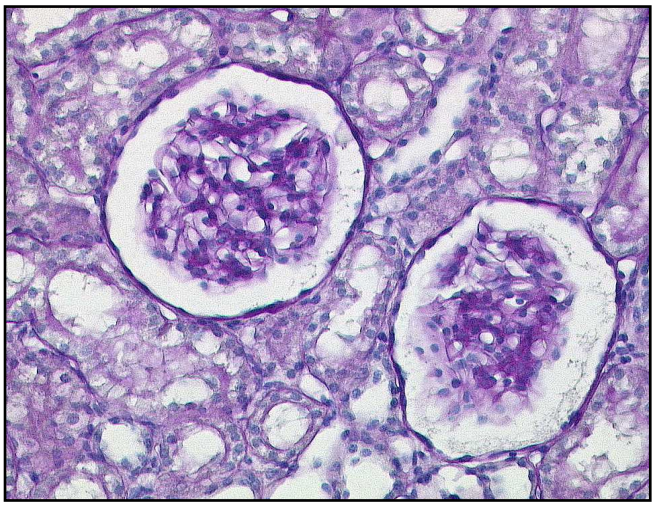

Abb. 31: Glomerula mit normal weitem Kapselraum vor Okklusion (Kontrollgruppe, periodic acid Schiff Reaktion)

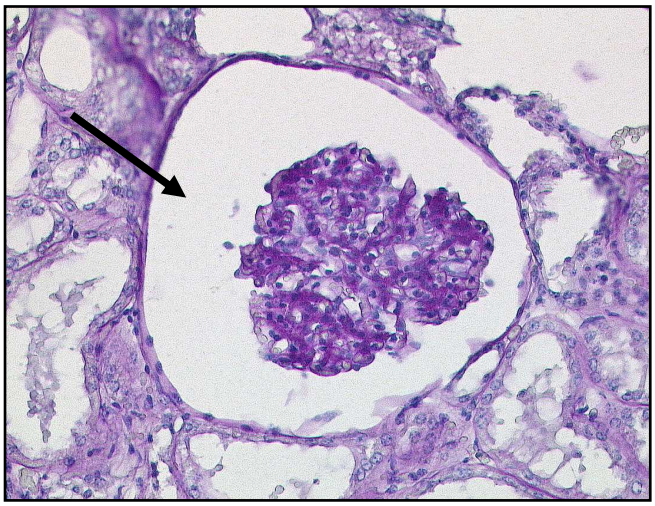

Abb. 32: dilatierte Bowmansche Kapsel nach Okklusion (Pfeil, Kontrollgruppe, periodic acid Schiff Reaktion)



Abb. 33: dilatierte Bowmansche Kapsel nach Okklusion (Pfeil, carbamyliertes Erythropoetin Gruppe, periodic acid Schiff Reaktion)

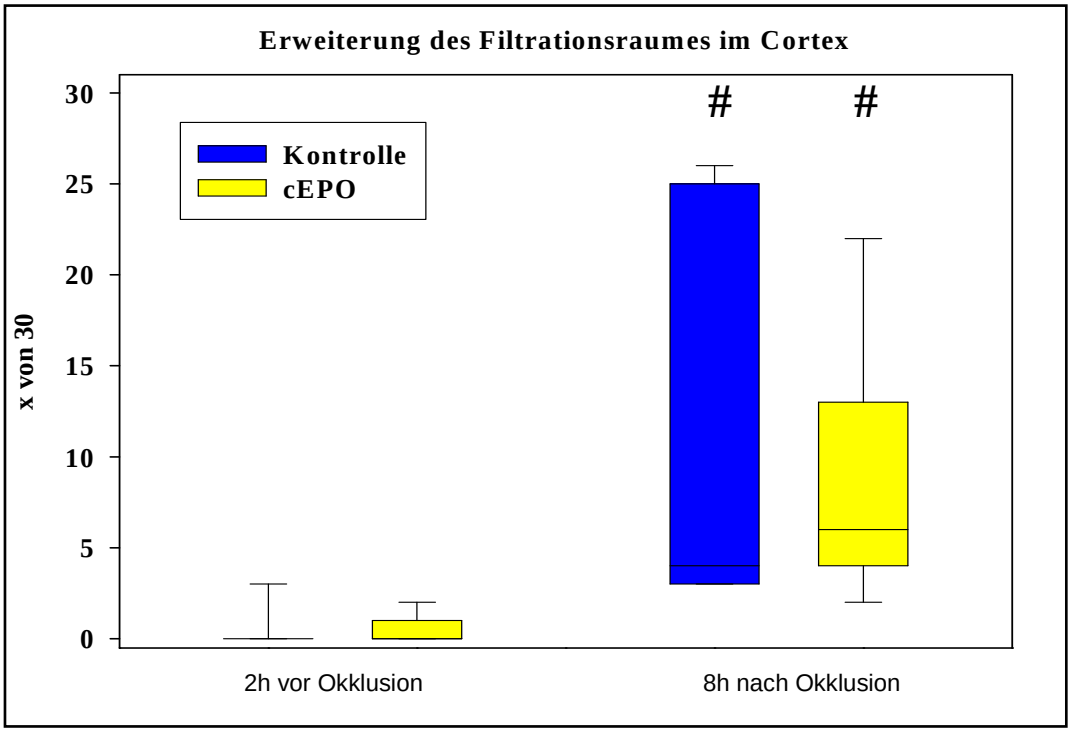

Abb. 34: Dilatation des Filtrationsraumes der Bowmanschen Kapsel in der Cortexregion beider Gruppen vor und nach Okklusion. Signifikanter Anstieg in beiden Gruppen (#, p = 0,016). Kein signifikanter Unterschied zw. den Gruppen. Angabe als absolute Zahl, Darstellung als Boxplot. cEPO: carbamyliertes Erythropoetin

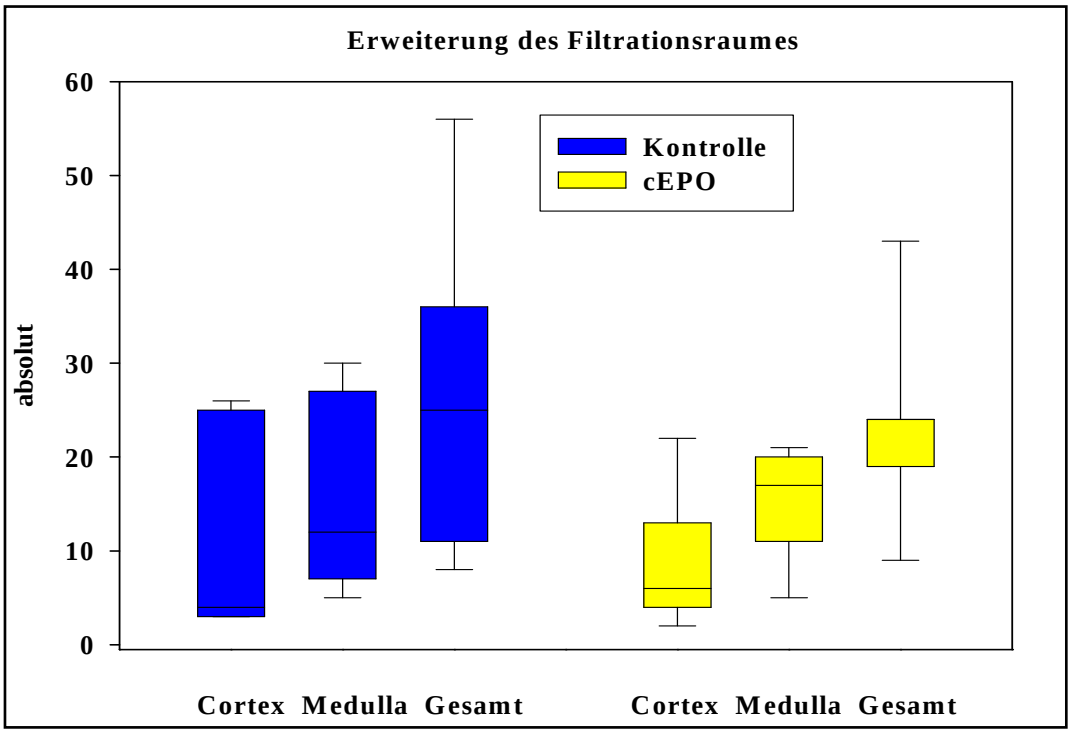

Abb. 35: Dilatation des Filtrationsraumes der Bowmanschen Kapsel in der kortikalen, juxtamedullären (Medulla) und gesamten Region nach Okklusion. Die Auswertung zu Cortex und Medulla bezieht sich auf 30, die Gesamtauswertung auf 60 Glomerula. Keine signifikanten Unterschiede zw. den Gruppen, keine signifikante regionale Häufung. Angabe als absolute Zahl, Darstellung als Boxplot. cEPO: carbamyliertes Erythropoetin

zu 1.2 glomeruläre Tubularisation

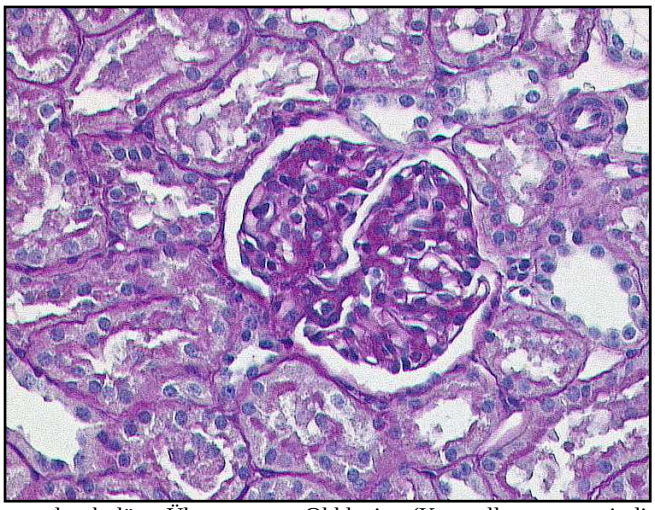

Abb. 36: Normaler glomerulotubulärer Übergang vor Okklusion (Kontrollgruppe, periodic acid Schiff Reaktion)

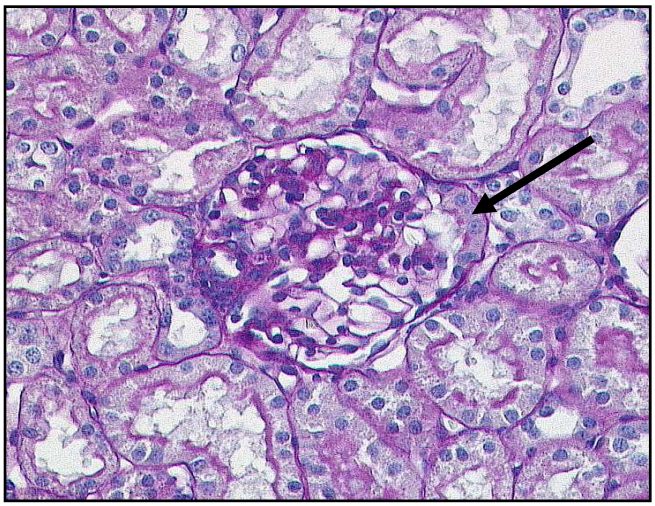

Abb. 37: glomeruläre Tubularisation bereits vor Okklusion (Pfeil, Kontrollgruppe, periodic acid Schiff Reaktion)

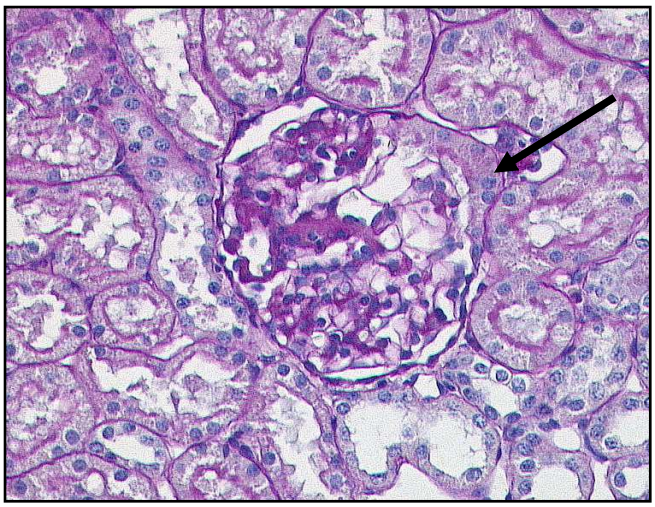

Abb. 38: glomeruläre Tubularisation nach Okklusion (Pfeil, carbamyliertes Erythropoetin Gruppe, periodic acid Schiff Reaktion)

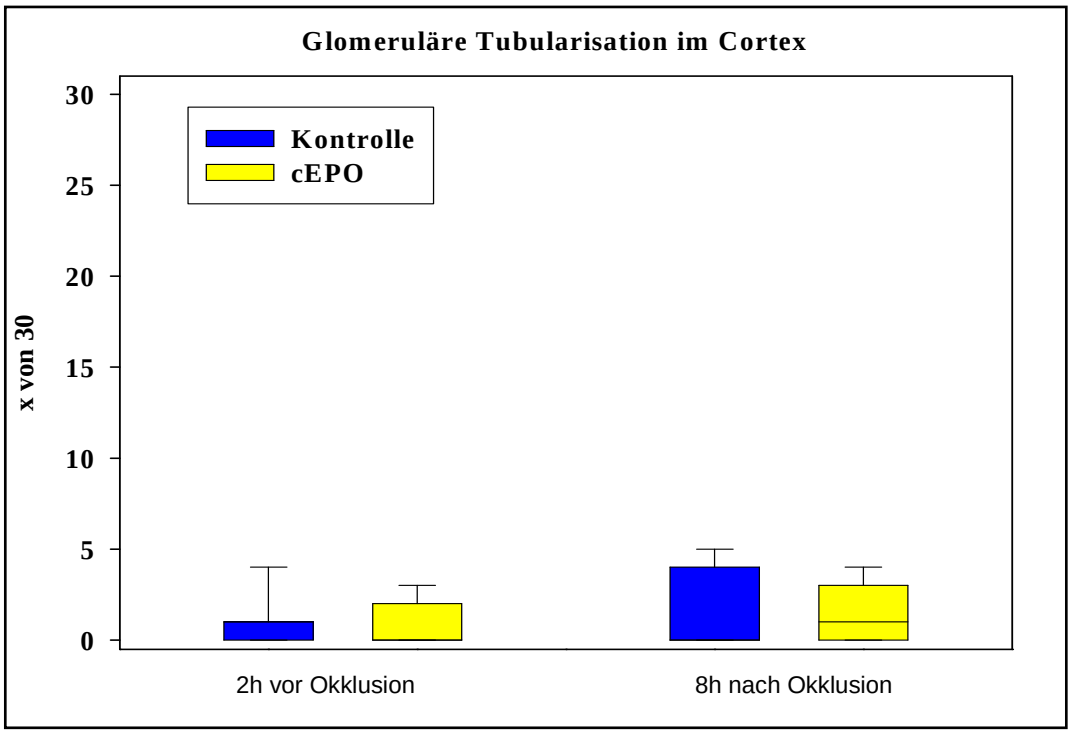

Abb. 39: Glomeruläre Tubularisation in der Cortexregion beider Gruppen vor und nach Okklusion. Kein signifikanter Unterschied innerhalb oder zwischen den Gruppen. Angabe als absolute Zahl, Darstellung als Boxplot. cEPO: carbamyliertes Erythropoetin

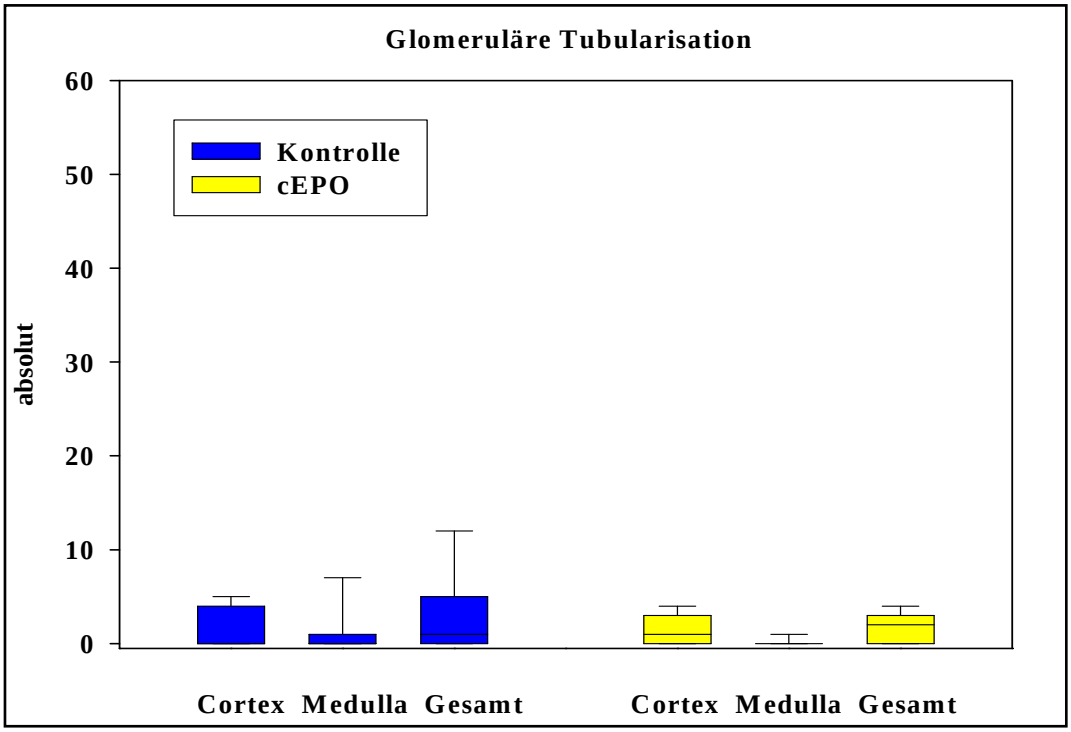

Abb. 40: Glomeruläre Tubularisation in der kortikalen, juxtamedullären (Medulla) und gesamten Region 8 h nach Okklusion. Die Auswertung zu Cortex und Medulla bezieht sich auf 30, die Gesamtauswertung auf 60 Glomerula. Keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen, keine signifikante regionale Häufung. Angabe als absolute Zahl, Darstellung als Boxplot. cEPO: carbamyliertes Erythropoetin

zu 1.3 Verdickung des parietalen Epithels der Bowmanschen Kapsel

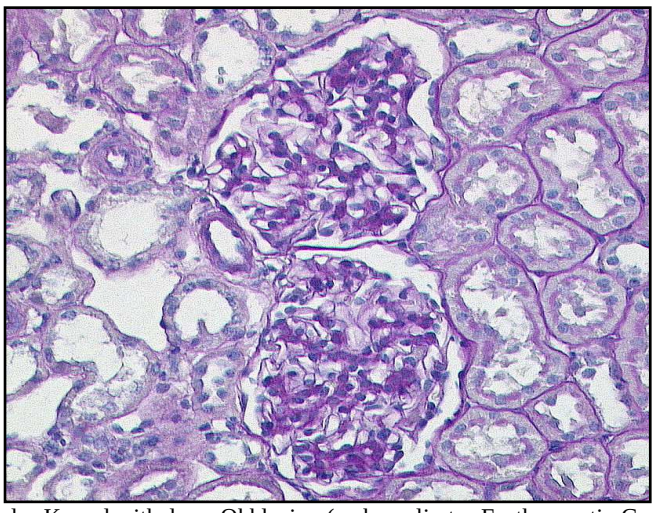

Abb. 41: normales parietales Kapselepithel vor Okklusion (carbamyliertes Erythropoetin Gruppe, periodic acid Schiff Reaktion)

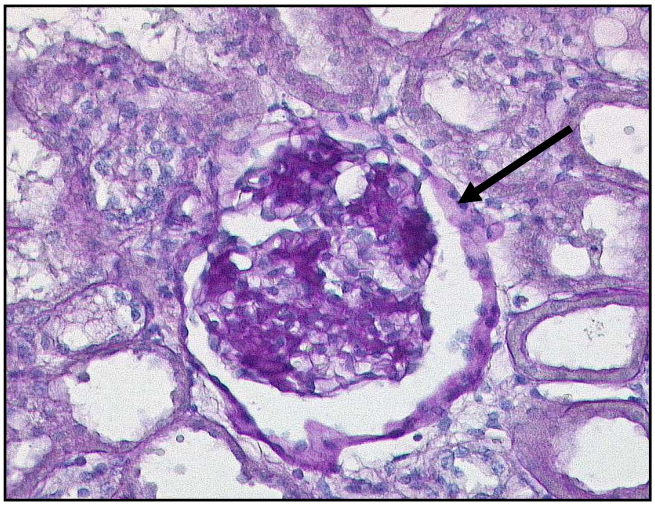

Abb. 42: fast vollständige Verdickung des parietalen Epithels nach Okklusion (Pfeil, carbamyliertes Erythropoetin Gruppe, periodic acid Schiff Reaktion)

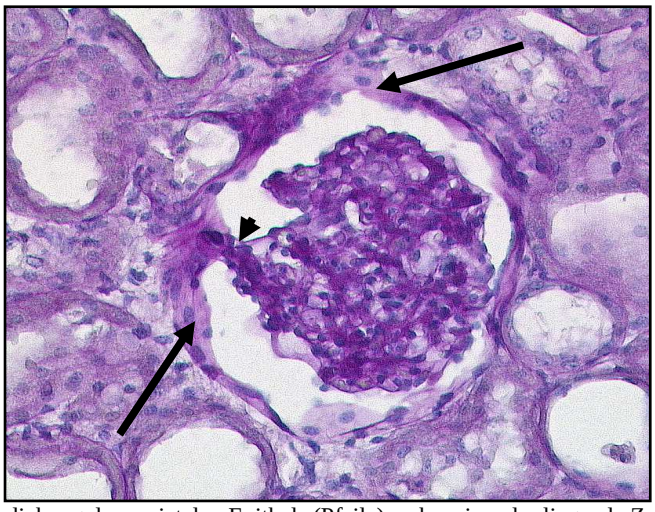

Abb. 43: fokale starke Verdickung des parietalen Epithels (Pfeile), nebeneinander liegende Zellkerne, Verwachsung zw. Epithel und Kapillarbäumchen (Pfeilspitze) nach Okklusion (Kontrollgruppe, periodic acid Schiff Reaktion)

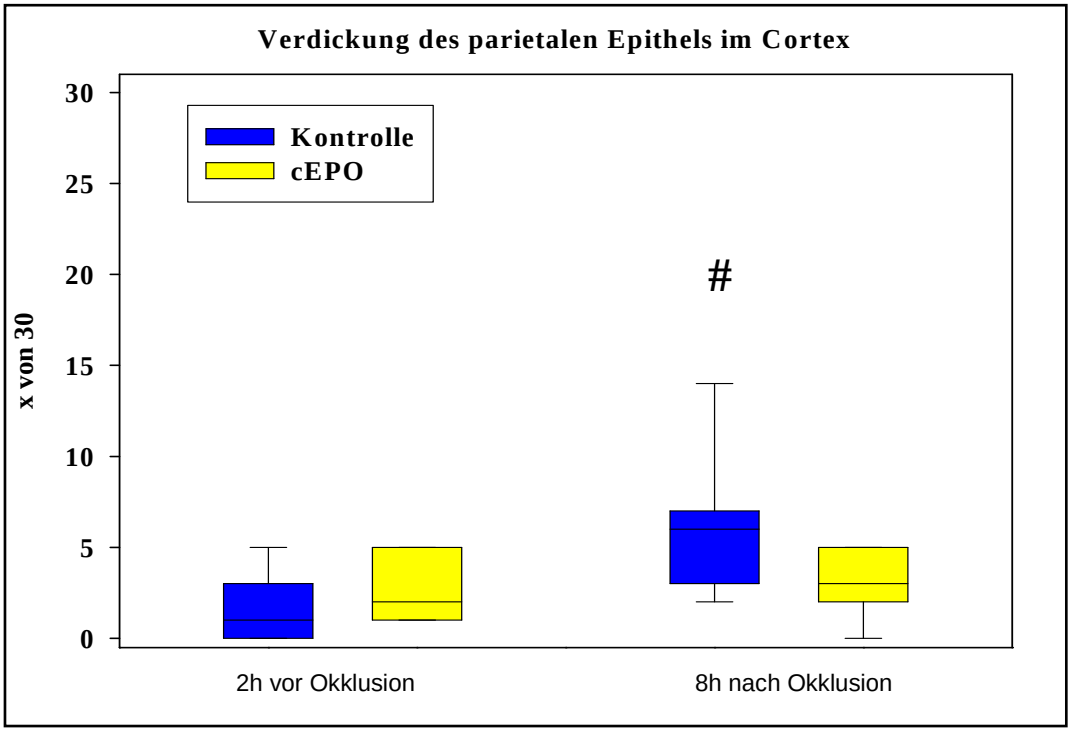

Abb. 44: Verdickung des parietalen Epithels der Bowmanschen Kapsel in der Cortexregion beider Gruppen vor und nach Okklusion. Signifikanter Anstieg in Kontrollgruppe (#, p = 0,017). Kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen. Angabe als absolute Zahl, Darstellung als Boxplot. cEPO: carbamyliertes Erythropoetin

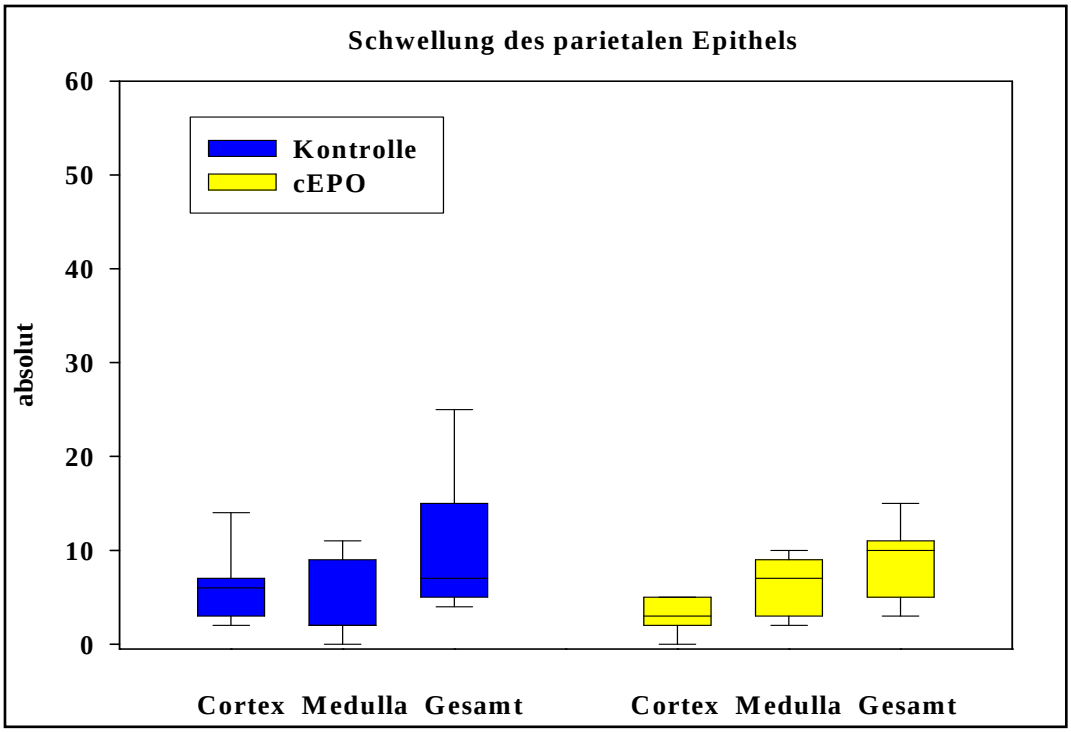

Abb. 45: Verdickung des parietalen Epithels der Bowmanschen Kapsel in der kortikalen, juxtamedullären (Medulla) und gesamten Region 8 h nach Okklusion. Die Auswertung zu Cortex und Medulla bezieht sich 30, die Gesamtauswertung auf 60 Glomerula. Keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen, keine signifikante regionale Häufung. Angabe als absolute Zahl, Darstellung als Boxplot. cEPO: carbamyliertes Erythropoetin

zu 2.1 zytoplasmatisches Ödem

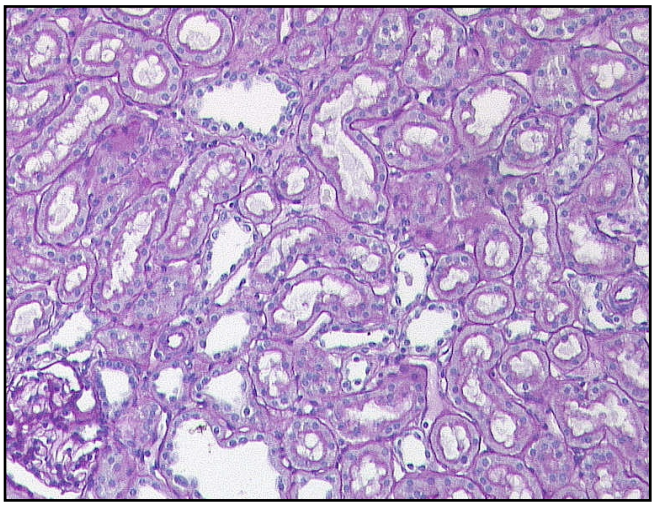

Abb. 46: normales Tubulusepithel vor Okklusion (Kontrollgruppe, periodic acid Schiff Reaktion)

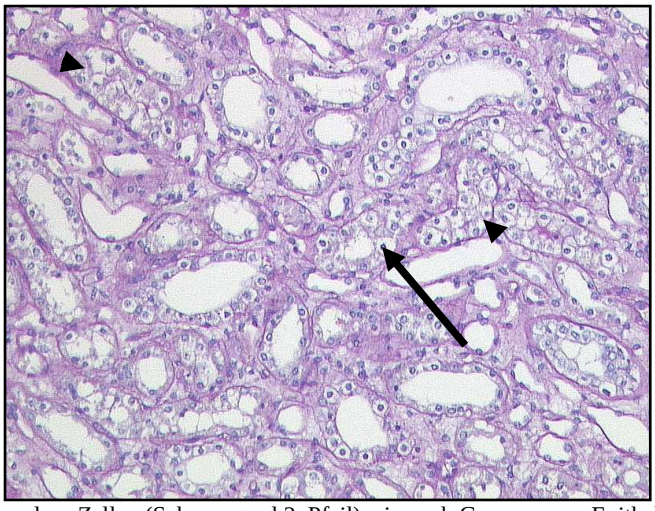

Abb. 47: Schwellung einzelner Zellen (Schweregrad 2, Pfeil) wie auch Gruppen von Epithelzellen (Schweregrad 3, Pfeilspitzen) nach Okklusion (carbamyliertes Erythropoetin Gruppe, periodic acid Schiff Reaktion)

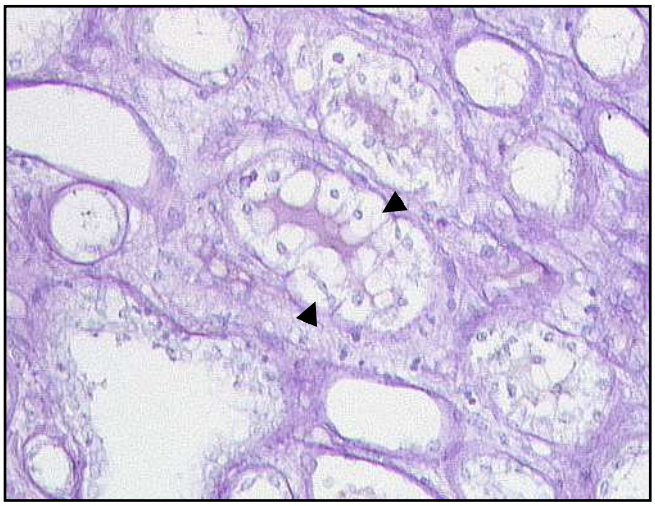

Abb. 48: stark geschwollene Gruppe von Epithelzellen (Schweregrad 3, Pfeilspitzen) nach Okklusion, hier bei 200facher Vergrößerung (carbamyliertes Erythropoetin Gruppe, periodic acid Schiff Reaktion)

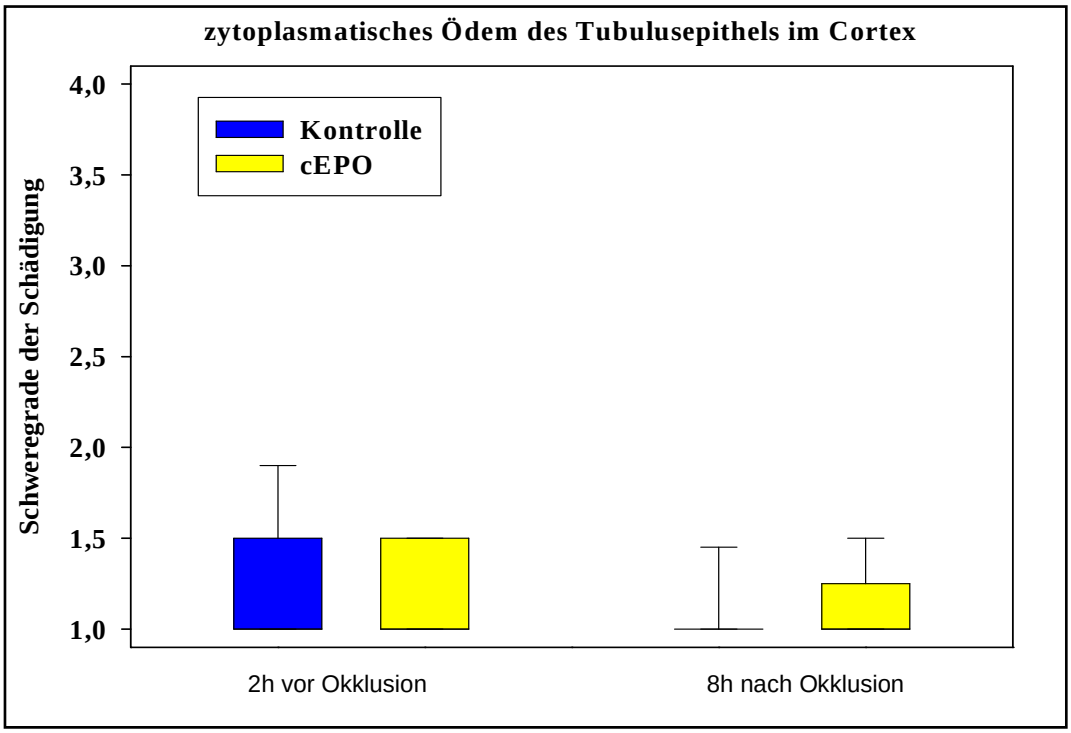

Abb. 49: zytoplasmatisches Ödem des Tubulusepithels in der Cortexregion beider Gruppen vor und nach Okklusion. Kein signifikanter Unterschied zu den beiden Messzeitpunkten. Kein signifikanter Unterschied zw. den Gruppen. Angabe als absolute Zahl, Darstellung als Boxplot. cEPO: carbamyliertes Erythropoetin

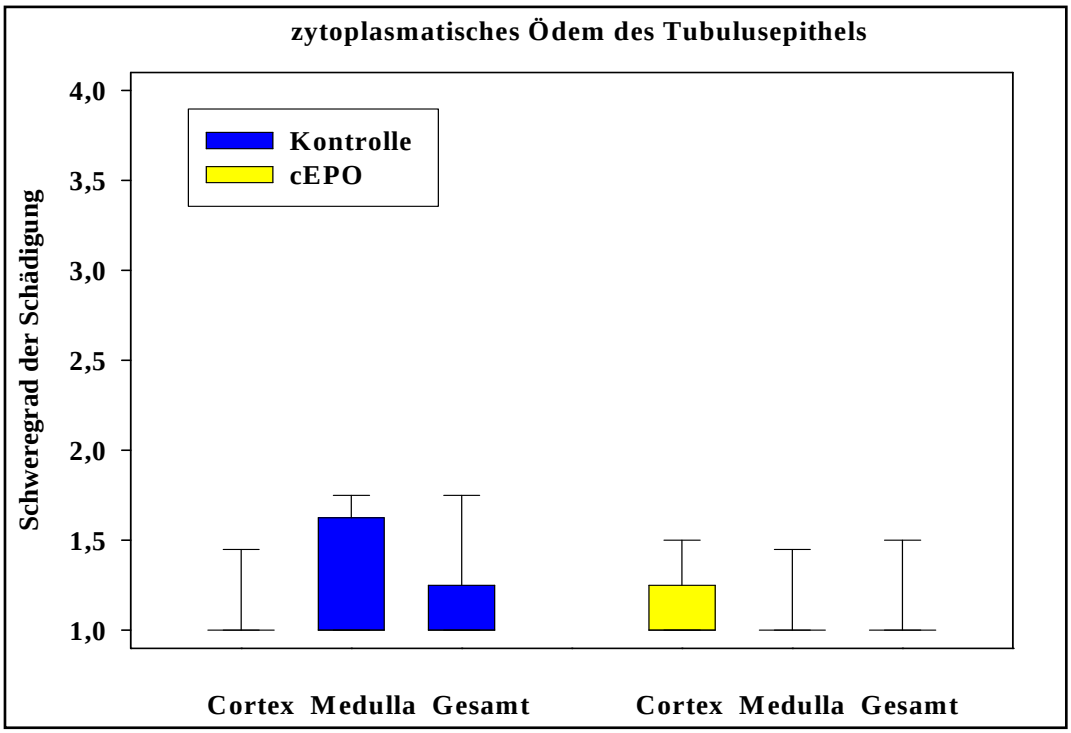

Abb. 50: Zytoplasmatisches Ödem des Tubulusepithels in beiden Gruppen, aufgeschlüsselt nach kortikaler und medullärer Region und Gesamtpräparat 8 h nach Okklusion. Keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen, keine signifikante regionale Häufung. Angabe als absolute Zahl, Darstellung als Boxplot. cEPO: carbamyliertes Erythropoetin

zu 2.2 Dilatation der Tubuli

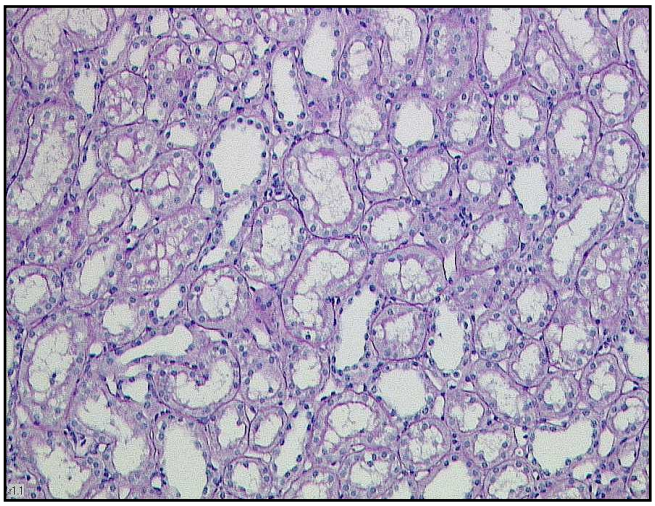

Abb. 51: normales kubisches Tubulusepithel, normale Luminaweite vor Okklusion (carbamyliertes Erythropoetin Gruppe, periodic acid Schiff Reaktion)

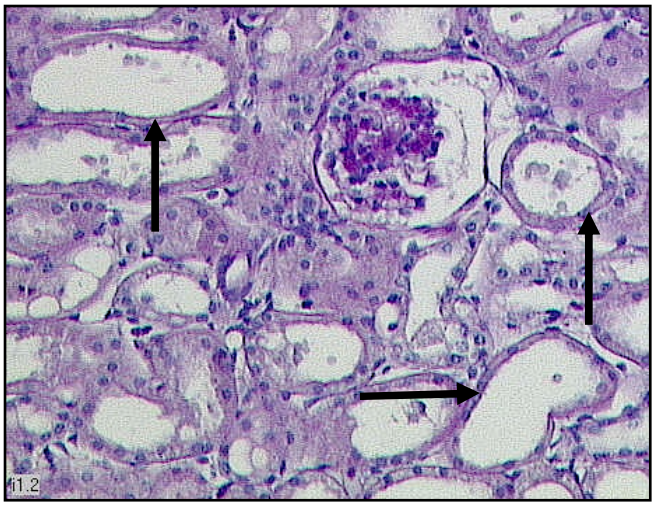

Abb. 52: Abflachung des Tubulusepithels (Schweregrad 3, Pfeile) nach Okklusion (Kontrollgruppe, periodic acid Schiff Reaktion)

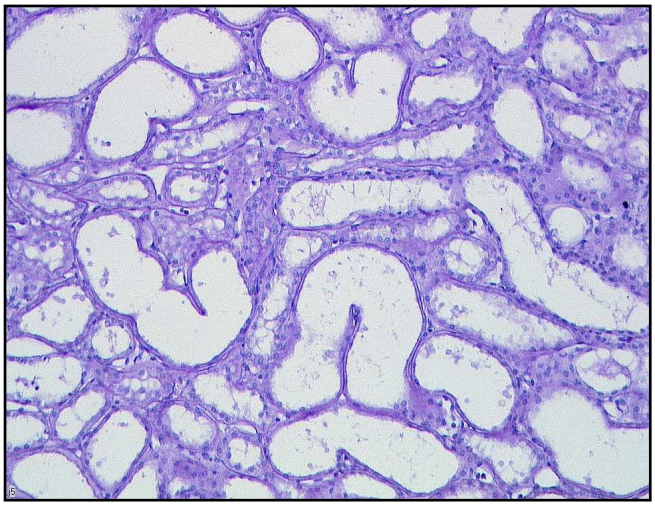

Abb. 53: ausgeprägte Dilatation der Lumina und Abflachung des Epithels im nahezu gesamten Bild nach Okklusion (Kontrollgruppe, periodic acid Schiff Reaktion)

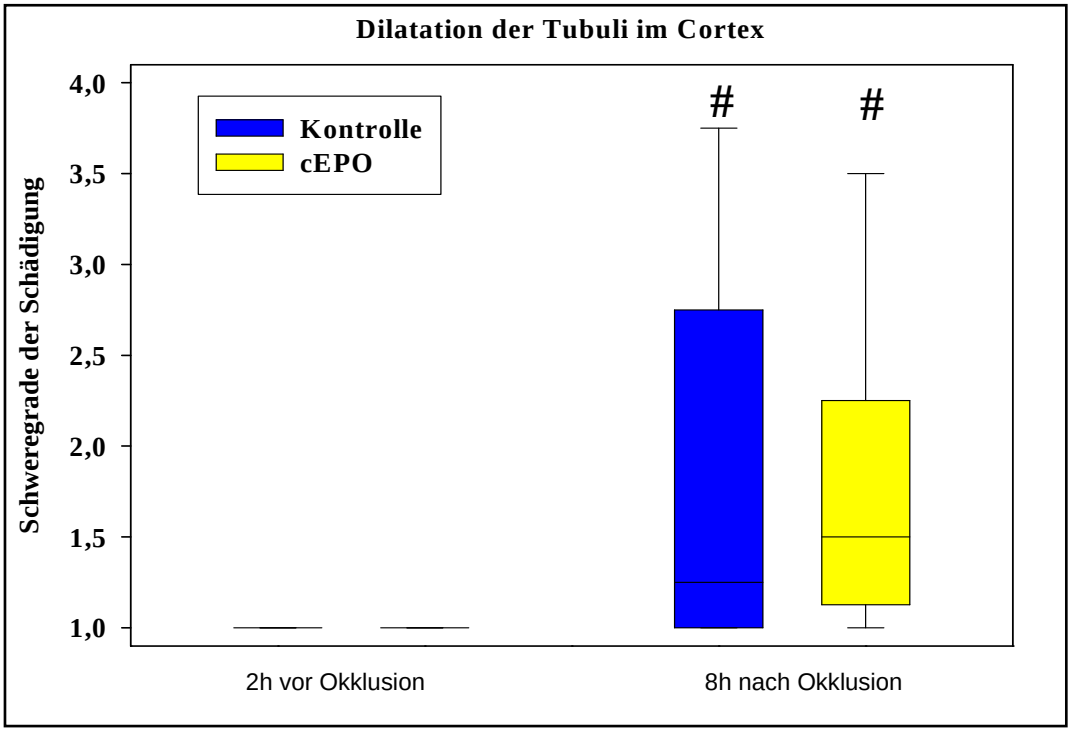

Abb. 54: Dilatation und Elongation der Tubuli in der Cortexregion beider Gruppen vor und nach Okklusion. Signifikanter Anstieg in beiden Gruppen (#, $p < 0{,}001$ für beide Gruppen). Kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen. Angabe als absolute Zahl, Darstellung als Boxplot. cEPO: carbamyliertes Erythropoetin

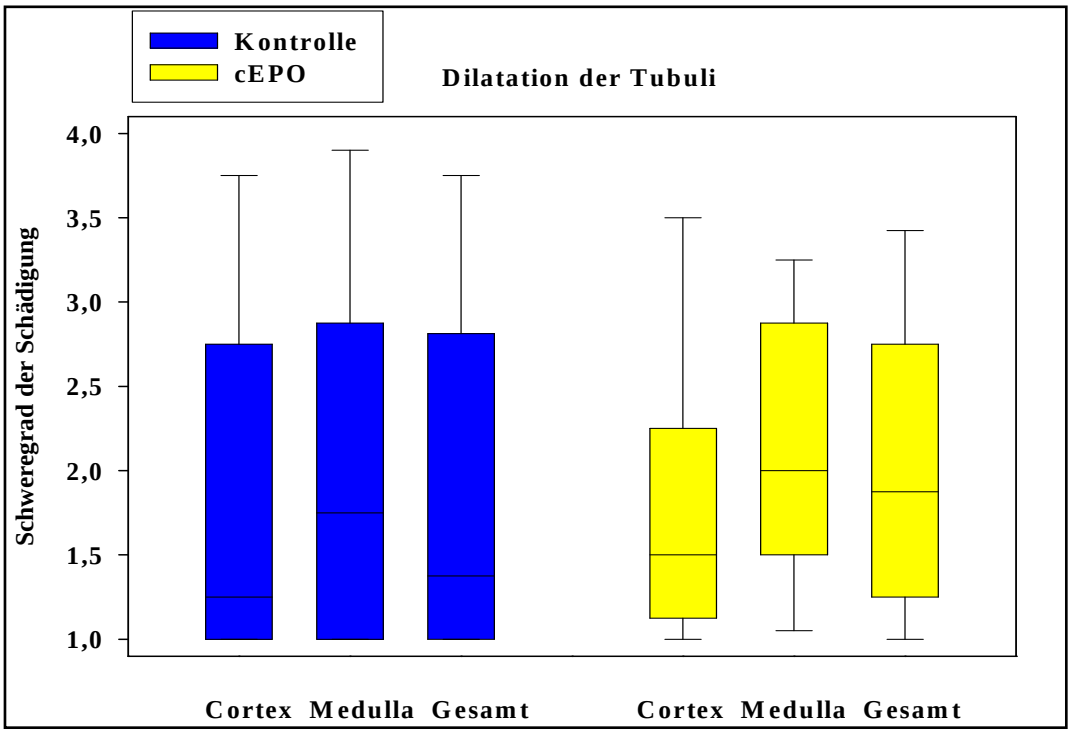

Abb. 55: Dilatation und Elongation der Tubuli in beiden Gruppen nach kortikaler und medullärer Region und Gesamtpräparat aufgeschlüsselt 8 h nach Okklusion. Kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen, keine signifikante regionale Häufung. Angabe als absolute Zahl, Darstellung als Boxplot. cEPO: carbamyliertes Erythropoetin

zu 2.3 Tubulusepithelverlust

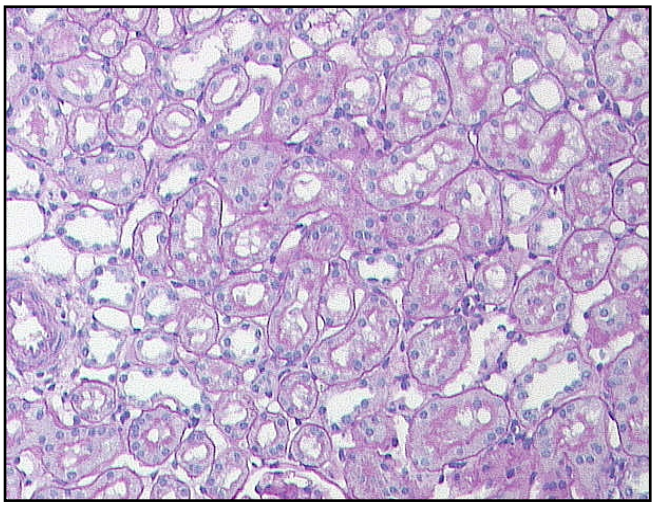

Abb. 56: intakte Tubuli vor Okklusion (Kontrollgruppe, periodic acid Schiff Reaktion)

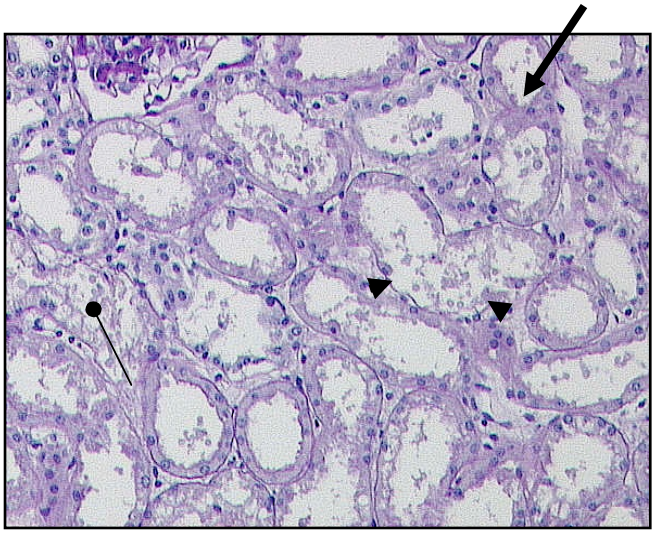

Abb. 57: Epithelzellverlust (Schweregrad 2, Pfeil), Gruppenzellverlust (Schweregrad 3, Pfeilspitzen), einzelne Nekrosen (Schweregrad 4, Punktpfeil) nach Okklusion (carbamyliertes Erythropoetin Gruppe, periodic acid Schiff Reaktion)

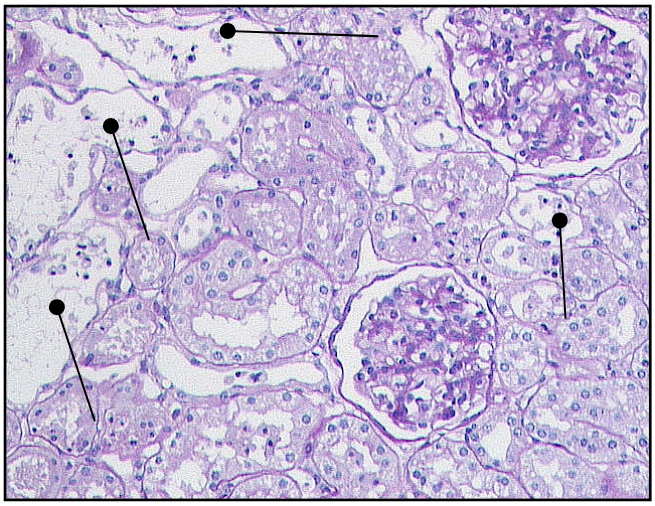

Abb. 58: fokale Nekrosen (Schweregrad 4, Rundpfeile) nach Okklusion (Kontrollgruppe, periodic acid Schiff Reaktion)

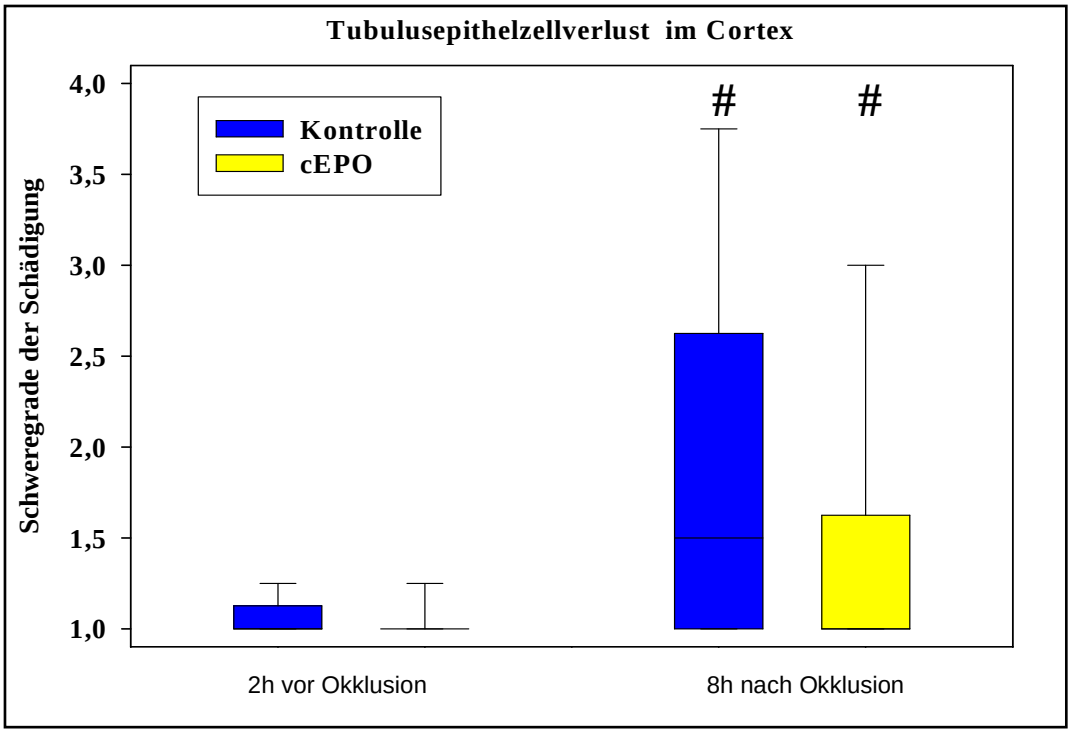

Abb. 59: Tubulusepithelverlust in der Cortexregion beider Gruppen vor und nach Okklusion. Signifikanter Anstieg in beiden Gruppen (#, p = 0,002 Kontrolle, p = 0,017 cEPO) Kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen. Angabe als absolute Zahl, Darstellung als Boxplot. cEPO: carbamyliertes Erythropoetin

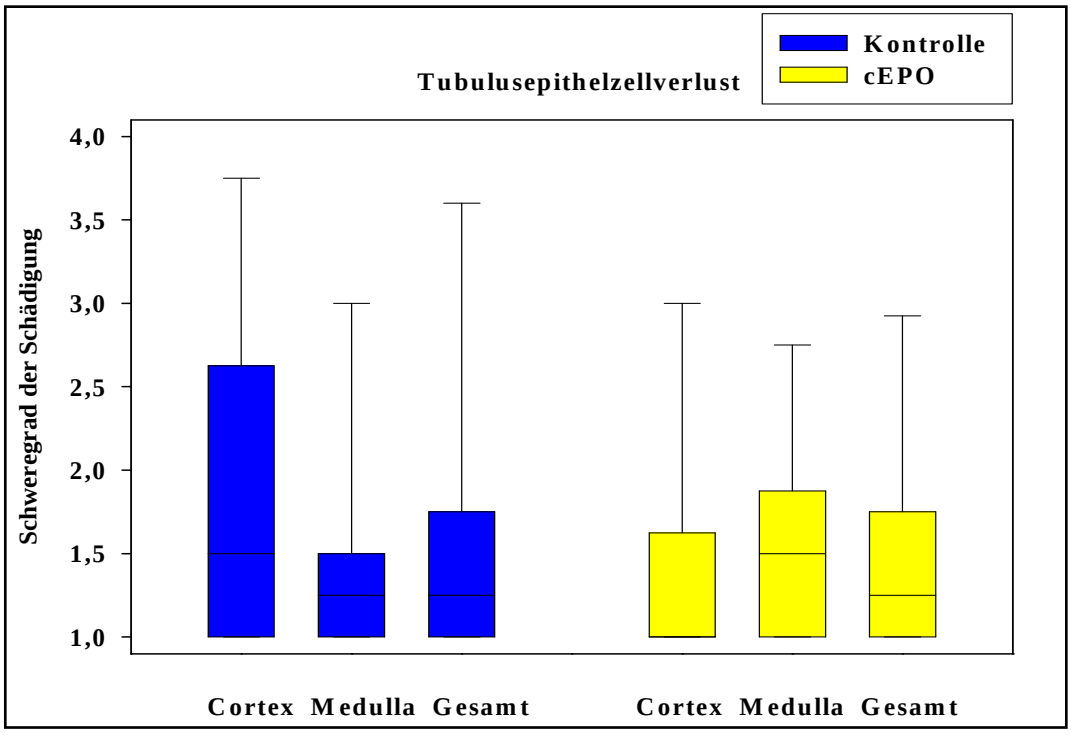

Abb. 60: Tubulusepithelzellverlust in beiden Gruppen nach kortikaler und medullärer Region und Gesamtpräparat aufgeschlüsselt 8 h nach Okklusion. Keine statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen, keine signifikante regionale Häufung. Angabe als absolute Zahl. Darstellung als Boxplot. cEPO: carbamyliertes Erythropoetin

Eine Dilatation der Bowmanschen Kapsel mit Erweiterung des Filtrationsraumes ist eine häufige Veränderung, die in nur sehr wenigen vor, dafür aber bei allen Präparaten nach Okklusion auftrat. Dabei bleiben die Kapillarschlingen und das Mesangium unverändert oder scheinen eher dichter zu werden, das Gesamtglomerulum schwillt auf das zwei- bis dreifache der Ursprungsgröße an, der Filtrationsraum ist extrem geweitet. In beiden Gruppen zeigte sich ein signifikanter Anstieg, ein Unterschied zwischen den Gruppen gab es nicht. Eine tendenzielle, statistisch nicht signifikante, regionale Häufung zeigte sich in der cEPO Gruppe, hier schienen die juxtamedullären Glomerula vermehrt betroffen zu sein.

Die glomeruläre Tubularisation wird zu den charakteristischen Veränderungen der Niere nach akuter Ischämie gezählt [49]. Das Epithel der proximalen Tubuli wächst retrograd in die Bowmansche Kapsel ein, bei maximaler Ausprägung füllt das Epithel die gesamte Zirkumferenz der Kapsel aus. Es bleibt jedoch einschichtig und liegt dem parietalen Blatt der Bowmanschen Kapsel eng an. In der PAS-Färbung kann man die identische Anfärbarkeit dieser und der proximalen Tubulusepithelzellen gut erkennen. Eine geringe Tubularisation konnte bereits zu Beginn des Versuches beobachtet werden, insgesamt war die Ausprägung gering und hat nicht signifikant zugenommen. Auch zwischen den beiden Gruppen zeigte sich kein signifikanter Unterschied, eine regionale Häufung konnte nicht beobachtet werden.

Das parietale Epithel der Bowmanschen Kapsel ist die äußere Begrenzung des Filtrationsraumes. Dieses Epithel war sowohl zu Anfang wie auch zum Versuchsende im unterschiedlichen Ausmaße aufgequollen und verdickt, die Zellkerne lagen teilweise nebeneinander und es kam sogar zu Verwachsungen mit dem Kapillarbäumchen im Glomerulum. Normalerweise ist das Epithel einschichtig und als eine dünne, glatte Linie mit spindelförmigen, hintereinander liegenden Zellkernen sichtbar. Insgesamt kam es zu einer mittelstarken Ausprägung und sie hat nur in der Kontrollgruppe signifikant zugenommen. Zwischen den beiden Gruppen zeigten sich keine signifikanten Unterschiede, eine regionale Häufung konnte nicht eindeutig beobachtet werden.

Das zytoplasmatische Ödem zählt zu den akuten ischämischen Tubulusschädigungen und ist prinzipiell reversibel. Vor allem die empfindlichen proximalen Tubulusepithelzellen reagieren auf Hypoxie mit Schwellung und später mit Exfoliation. Insgesamt war dieses Merkmal mäßig ausgeprägt, es zeigten sich keine signifikanten Veränderungen oder regionale Häufungen.

Eine Dilatation und damit einhergehende Verschmälerung der Tubuli gehört auch zu den

akuten ischämischen Tubulusschädigungen. Eine postrenale Obstruktion als Ursache ist auszuschließen, da bei jedem Tier zügig ein suprapubischer Blasenkatheter gelegt wurde. Diese Veränderung war teils sehr ausgeprägt und kam ausschließlich in Nierenpräparaten nach Versuchsende vor. Als Referenz diente bei der Auswertung das Bild 732/1 N0, ein Normalbefund. In beiden Gruppen kam es zu einer ausgeprägten Zunahme der Dilatation, eine regionale Häufung oder ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen konnte jedoch nicht beobachtet werden.

Eine schwerwiegende, irreversible, subakute ischämische Tubulusschädigung ist die Epithelablösung und der Epithelverlust. In maximaler Ausprägung kommt es zu Nekrose und Einwanderung von Entzündungszellen. Eine deutliche Inflammation konnte in keinen der Präparate beobachtet werden, es wurden nur fokale Nekroseherde in drei Präparaten beobachtet. Insgesamt kam es zu einer statistisch signifikanten Zunahme dieses Schädigungsmusters in beiden Gruppen 8 h nach Okklusion. Eine tendenzielle Häufung in der kortikalen Region kann in der Kontrollgruppe vermutet werden, es zeichneten sich keine relevanten Unterschiede zwischen den Gruppen ab.

4. Diskussion

In dieser Studie wurden eventuelle renoprotektive Eigenschaften von cEPO während einer Ischämie und Reperfusion des Organs am Schweinemodell untersucht. Die Induktion einer Ischämie/Reperfusionssequenz durch ein Abklemmen oder Verschließen eines Gefäßes mit einem Ballonkatheter (Ballonokklusion) ist ein gut etabliertes Modell, das vielfach Anwendung findet und als klinisch relevant angesehen werden kann [35, 85, 97, 99, 100, 103, 104, 117]. Das Schweinemodell wurde bereits vielfach in der Sektion der Anästhesiologischen Pathophysiologie und Verfahrensentwicklung verwendet [7, 43, 99, 100, 102, 103, 104]. Diese Studie wurde an einem weiter optimierten Modell durchgeführt, das so bisher nicht zum Einsatz kam. Die spezielle Schweinezüchtung FBM entwickelt bereits früh eine generalisierte Atherosklerose, weist so eine hohe Analogie zu einem gefäßchirurgischen Patienten auf und liefert somit relevantere Ergebnisse und Erkenntnisse, als es in einem Kleintiermodell jemals möglich wäre.

Der Einsatz von cEPO ist noch nicht hinreichend untersucht [12, 16, 48, 56, 104, 123, 124, 125], eine Studie mit Fokus auf eine Renoprotektion durch cEPO im Großtiermodell wurde bis dato nicht veröffentlicht.

Im Rahmen dieser Untersuchung sollten renoprotektive Eigenschaften von cEPO auf mehreren Ebenen untersucht werden: Immunmodulation, Schutz vor Sauerstoff- und Stickstoffradikalen, Verhinderung einer Apoptose und Nekrose und Erhalt der Nierenfunktion, um so einem akuten Nierenversagen zuvorzukommen.

Die Ergebnisse sollen ein Bild über die Wirksamkeit und Wirkweise von cEPO geben und als Entscheidungsgrundlage für zukünftige klinische Einsätze z.B. bei gefäßchirurgischen Patienten dienen.

4.1 Das Studienmodell

4.1.1 Vergleichbarkeit der Gruppen

Etwaige Unterschiede zwischen den beiden Gruppen sollen auf die Wirksamkeit von cEPO zurückgeführt werden. Deshalb müssen die Gruppen bezüglich perioperativer Parameter vergleichbar sein. Es wurden Herz- und Kreislauffunktion, Temperatur, Gasaustausch, Säuren-Basen-Haushalt und Noradrenalinbedarf überwacht.

Zu allen Zeitpunkten war eine adäquate Oxygenierung der Tiere gewährleistet, was aus den O_2 Werten im arteriellen Blut ersichtlich ist. In beiden Gruppen kam es während der Reperfusionsphase zu einem Abfall des pH-Wertes sowohl in arteriellen wie auch in

renalvenösen Blut bei konstanten CO_2 Werten, was einer metabolische Azidose entspricht. Analog kam es zu einem Laktatanstieg im arteriellen und renalvenösen Blut nahezu aller Tiere, vor allem nach 4 h Reperfusion, und einem Abfall des Base Excess bei allen Tieren. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass die induzierte Mangelperfusion aller ischämischer Organe zur Umstellung auf anaerobe Glykolyse und identischer Stressantwort aller Tiere führte.

Die systemischen hämodynamischen Parameter blieben bei allen Tieren konstant, makrozirkulatorisch konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen beobachtet werden. Erwähnenswert ist allerdings ein tendenziell niedriger Noradrenalinbedarf in der cEPO-Gruppe, dieser blieb jedoch ohne statistische Signifikanz. Dieser Aspekt resultierte jedoch in einem statistisch durchaus signifikant höheren Schlagvolumen in der cEPO Gruppe. In anderen Arbeiten konnte durch die Gabe von cEPO eine verbesserte myokardiale Funktion und Kontraktilität des linken Herzens nach I/R beobachtet werden, von einem vergleichbaren Effekt kann in dieser Studie ausgegangen werden [36, 124, 125]. Dieser Parameter beeinflusste die Organperfusion jedoch nicht.

Weiterhin kam es zu einem Anstieg der Hämoglobinkonzentration gemittelt um zwei Punkte in der Reperfusionsphase. Am ehesten ist dies durch eine Hämokonzentration auf Grund einer Verschiebung intravasaler Flüssigkeit in den so genannten 3. Raum zu erklären, denn alle Tiere hatten einen mehr oder weniger ausgeprägten Aszites nach Beendigung des Versuches. Ein Effekt von cEPO auf den Hämatokrit kann ausgeschlossen werden, insbesondere angesichts der einmaligen akuten Gabe. Unabhängig davon soll cEPO aufgrund seiner selektiven Affinität zum ERO-R-Heterodimer, wie in der Arbeit von Coleman et al. ausführlich untersucht [22] und bereits in der Einleitung dieser Arbeit beschrieben, keine hämatopoetischen Eigenschaften zeigen.

Sehr interessant war der Temperaturabfall bzw. bereits zu Beginn des Versuches erniedrigte Körperkerntemperatur bei 13 von 14 Tieren. Es ist bekannt, dass Hypothermie, sei es durch äußere Umstände oder durch künstliche Kühlung, organprotektiv wirken kann [21, 28, 46, 111]. Nichtsdestotrotz kam es bei allen Tieren zu einer eindeutigen Funktionseinbuße der Niere und einer systemischen Stressantwort.

4.1.2 Renale Schädigung

Eine Ballonokklussion ist ein gefäßschonendes Verfahren, das zu einem vollständigen Verschluss der Aorta genauso wie bei einem Cross-Clamping führt. Sie wurde bereits bei anderen Versuchen in der Sektion erfolgreich eingesetzt [7, 43, 100, 103, 104]. Die

korrekte Platzierung und Funktion wurden über eine auf einer Nierenarterie angebrachten Ultraschallsonde und über eine Blutdrucksensor via einen Katheter in der Femoralarterie überprüft. Es konnte eine deutliche akute Nierenfunktionseinschränkung erzielt werden: alle Tiere zeigten einen Anstieg der fraktionellen Natriumexkretion und einen deutlichen bis extremen Abfall der Kreatininclearance, eins der Kriterien eines akuten Nierenversagens, zudem zeigten die meisten Tiere eine Polyurie, welche im Rahmen dieses Krankheitsbildes sehr häufig auftritt. In Anlehnung an die RIFLE und AKIN Klassifikationen, welche der klinischen Definition und Staging eines akuten Nierenversagens dienen (s. Abb. 60), befanden sich die untersuchten Tiere nach RIFLE im Injury oder Failure Stadium, nach AKIN im Stadium 2 oder 3. Das Kriterium der Urinproduktion konnte in diesem Versuch nicht herangezogen werden, da sich in dem kurzen Beobachtungszeitraum erstmals eine Polyurie zeigte.

Es muss gewiss in Betracht gezogen werden, dass diese Definitionen für die Humanmedizin erarbeitet wurden und sie für die frühe Detektion eines akuten Nierenversagens, wie in diesem achtstündigen Versuch, nur bedingt geeignet sind. In der AKIN Definition wird ein Kreatininvergleich innerhalb von 48 h empfohlen [27]. Weitere Schwächen dieser beiden Klassifikationen werden ausführlich durch Cruz et al. diskutiert [24]. Nichtsdestotrotz kann ein drohendes bis manifestes akutes Nierenversagen mit entsprechender Mortalitätsprognose abgeleitet werden. Der in der AKIN Klassifikation als prognostisch ungünstig gewertete Plasmakreatininanstieg konnte bei allen Tieren bereits nach 4 h Reperfusion beobachtet werden.

Es kann natürlich argumentiert werden, dass eine Ischämiezeit von 120 min als zu lang anzusehen ist. Baldwinn et al. konnten zeigen, dass 90 min warmer Ischämie in heminephrektomierten, anderweitig gesunden Schweinen zu keinen relevanten histologischen Schädigungen der verbliebenen Niere führte, also als sicher angesehen werden kann. Längere Zeiträume sollen jedoch irreversible Organschädigungen nach sich ziehen [6, 57, 80]. Andere Autoren belegten aber, dass auch Ischämien von 120 min gut toleriert werden, und es entweder zu einer kompletten [25, 82] oder zumindest partiellen Erholung der Tiere kam [79], oder eine funktionelle Einbuße ohne ein pathologisch-morphologisches Korrelat beobachtet wurde [47].

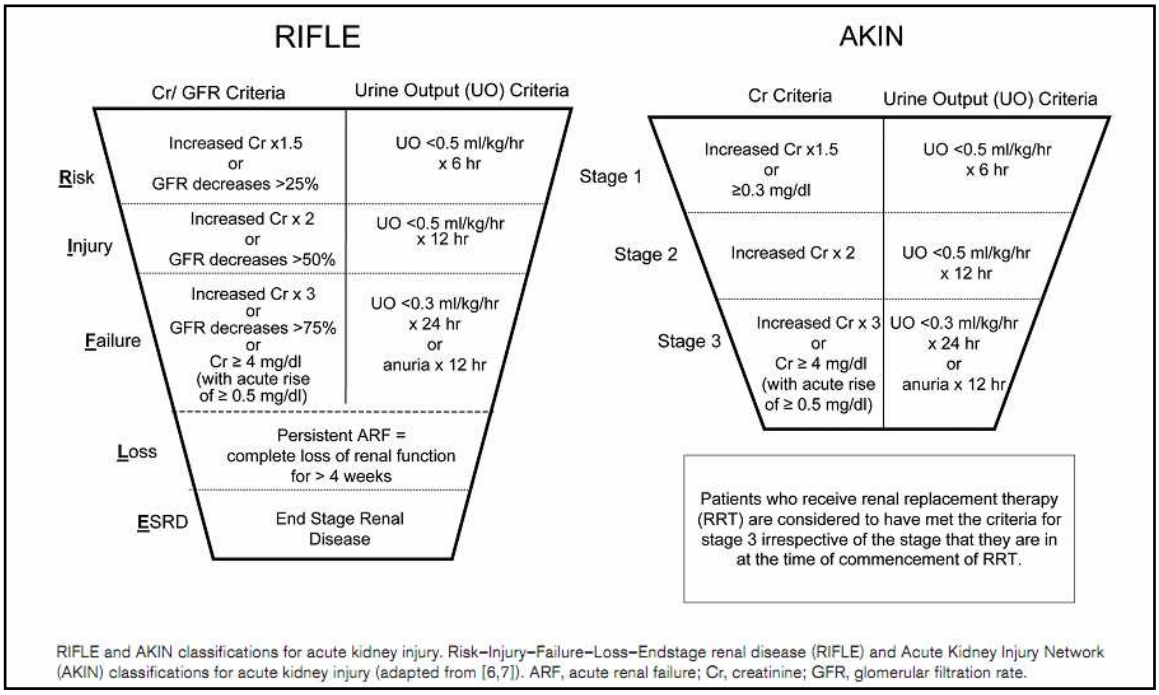

Abb. 61: RIFLE und AKIN Klassifikationen als Consensusdefinitionen zur Risikoabschätzung eines akuten Nierenversagens in der Akutmedizin. Kreatininanstieg um 0,3 mg/dl = 26,4 µmol/l, um 0,5 mg/dl = 44 µmol/l.
Übernommen aus Cruz et al: Clinical Review: RIFLE and AKIN – time for reappraisal. Crit Care 13:211 (2009)

Es müssen noch weitere Variablen in Betracht gezogen werden: die Art der operativen Gefäßokklusion und die Körperkern- und Organtemperatur. Induzierte oder durch Sepsis bedingte Hyperthermie, warme Ischämie ohne jegliche Organprotektion und Clamping aller Nierenhilusgefäße verschlechtern das Outcome erheblich [82, 86, 128]. Schirmer et al. konnten schon vor langer Zeit eindrücklich die deletären Folgen eines gleichzeitigen arteriellen und venösen Clampings der Nierengefäße zeigen, während durch das Clamping der Nierenarterie allein der Nierenmetabolismus besser erhalten werden konnte [92].

Eine gezielte Kühlung der Niere konnte in ex-vivo Transplantationsmodellen die Funktion des Organs auch nach sehr langen Zeiträumen erfolgreich erhalten [14, 54, 60]. In in-vivo Kleintier- und Großtiermodellen und auch in klinischen Studien konnten durch direkte Kühlung der Niere bis auf 15°C sehr gute protektive Effekte erzielt werden, so dass auch längere Ischämiezeiträume ohne Funktionseinbussen toleriert wurden [25, 65, 81, 121, 126]. Aber auch milde Hypothermien von 32°C bis 34°C Körperkerntemperatur führten zu Reduktion einer renalen Schädigung durch Ischämie und durch eine konsekutive Inflammation [15, 26, 70, 86, 129].

Bereits Zager et al. konnten in ihrer Studie an Raten und isolierten Mitochondrien beobachten, dass kleine Temperaturunterschiede von nur 0,5°C im physiologischen

Bereich zu besonders steilen Veränderungen von hochenergetischen Metaboliten und des Sauerstoffbeverbrauchs in renalen Gewebe führten. Wie bereits angeführt, kann eine ATP Depletion als die erste ischämische Veränderung gewertet werden, bevor es zu weiteren apoptotischen und nekrotischen Veränderungen der Zelle kommt. Diese Depletion konnte durch milde Hypothermie gebremst werden [128].

Eine ähnliche Situation konnte auch in diesem Modell beobachtet werden. Alle Tiere wiesen bereits während der operativen Vorbereitungsphase eine milde Hypothermie im Durchschnitt von 33.5±1.6°C in der Kontrollgruppe und 33,3±1.5°C in der cEPO Gruppe auf und es kann davon ausgegangen werden, dass dies zu einer Organprotektion führte. Normothermen deutschen Landschweinen mit 90 min Aortenokklusion gegenübergestellt, zeigten die Tiere erst nach 120 min Ischämie eine vergleichbare renale Funktionseinbusse. Somit kann die gewählte Okklusionszeit der Niere bei der FBM Schweinezüchtung vertreten werden.

4.2 Nierenprotektion auf funktioneller Ebene

Die Nierenfunktion wurde in diesem Versuch über die weit etablierten Marker Plasmakreatinin, Kreatininclearance und fraktionelle Natriumausscheidung evaluiert. Die Ergebnisse sind in soweit sehr interessant, da sie die Relevanz des gewählten Models erneut bestätigten: die Nierenfunktion war zu Beginn des Versuchs bei allen Tieren beeinträchtigt, wie dies auch häufig bei typischen gefäßchirurgischen Patienten der Fall ist. Dieser Faktor verschlechtert das Outcome einer Aneurysmasanierung erheblich (s. Einleitung). Der Normwert für Kreatininclearance bei gesunden Schweinen unter Vollnarkose liegt umgerechnet bei etwa 2,5 ml/min/kg KG. [83]. In dieser Versuchsreihe lagen die Werte in beiden Gruppen teilweise deutlich unterhalb dieser Grenze(im Mittel 1,27 und 1,60 ml/min/kg KG), ein Beweis für eine eingeschränkte glomeruläre Funktion. Für diese bereits bestehende Funktionseinschränkung konnten auch morphologisch einige Belege gefunden werden, was unter Abschnitt 5.6 noch erörtert werden soll. Die fraktionelle Natriumexkretion als ein Marker für die tubuläre Rückresorptionskapazität verhielt sich ähnlich, wenn man als Obergrenze 2% Natrium (bezogen auf Natrium im Plasma) im Urin festlegt, lagen 5 von 7 Tieren in der Kontrollgruppe und 3 von 7 Tieren in der cEPO Gruppe bereits zu Beginn des Versuches oberhalb dieses Wertes.

Alle Tiere der Kontroll- wie der cEPO Gruppe zeigten zum Ende des Versuches einen deutlichen bis extremen Abfall der Kreatininclearance im Mittel auf 20% des Ausgangswertes und einen deutlichen Anstieg der fraktionellen Natriumexkretion (im

Mittel um 35 Prozentpunkte). Der Anstieg des Plasmakreatinins als einer harnpflichtigen Substanz verhielt sich erwartungsgemäß (im Mittel um das 1,5fache).

Im Rahmen dieses Versuches wurde auch ein neuer, bis dato noch nicht etablierter, jedoch viel versprechender Marker, Neutrophilen Gelatinase-assoziiertes Lipocalin (NGAL) verwendet. Es ist zu erwarten, dass NGAL in Zukunft für die Nierendiagnostik herangezogen wird, sei es als alleiniger Parameter oder zur Ergänzung der bereits standardmäßig erhobenen Größen [27, 45, 63, 90, 91]. NGAL hat den großen Vorteil einer endogenen Substanz, eines raschen und deutlichen Anstiegs, der Organspezifität [siehe dazu 115] und kann sowohl im Plasma wie im Urin bestimmt werden. Auch in diesem Modell konnten diese Eigenschaften von NGAL gut beobachtet werden.

Zusammenfassend lässt sich sagen:

1. Alle Tiere wiesen bereits zu Beginn des Versuches eine mehr oder weniger eingeschränkte Nierenfunktion auf.
2. Alle Tiere erlitten auf funktioneller Ebene ein beginnendes akutes Nierenversagen mit einem Abfall der GFR im Mittel auf 20% des Ausgangswertes.
3. Eine Verbesserung oder Erhalt der Nierenfunktion durch eine Gabe von cEPO konnte nicht beobachtet werden, auch nach 8 Stunden Reperfusion kam es zu keinem relevanten Anstieg der GFR.

4.3 Modulation der Entzündungsreaktion

In diesem Modell wurden zwei Marker einer systemischen Entzündungsantwort untersucht, die regelmäßig nach einer I/R Sequenz ansteigen: TNFα und IL-6 [4, 58, 85, 97, 104].

Das Zytokin TNFα wird hauptsächlich von Makrophagen aber auch Endothelzellen bei systemischen und lokalen Entzündungen freigesetzt und moduliert die weitere Entzündungsantwort. Seine zentrale Rolle macht ihm unverzichtbar bei der Abwehr von Erregern, gleichzeitig aber kann eine unkontrollierte Freisetzung deletäre Folgen für den Organismus haben (Hypotonie, Schock). Seine Ausschüttung wird unter anderen durch NF-κB reguliert. TNFα reguliert wiederum die Aktivität von NF-κB und trägt somit zur Aktivierung oder Inhibierung von Caspasen (und somit Apoptose) bei [44].

IL-6 wird unter anderen durch TNFα und NF-κB reguliert, seine Schlüsselfunktion ist die Lymphozytenregulation des angeborenen und erworbenen Immunsystems und Aktivierung der Akute-Phase-Proteine. Es reagiert sehr schnell auf eine Schädigung von Gewebe und eignet sich deshalb hervorragend in der Akutdiagnostik [52].

NF-κB als ein Transkriptionsfaktor ist an der Regulation vielfältiger Gene beteiligt, welche bei der Steuerung der angeborenen und erworbenen Immunität, Zellproliferation und des Zellzyklus eine Rolle spielen. Dieser Transkriptionsfaktor wird im Zytosol durch inhibitorische Proteine wie IκBa reguliert [93]. NF-κB wird durch bakterielle und virale Antigene und auch ultraviolette oder Röntgenstrahlung aktiviert.

In dieser Arbeit wurde der Fokus auf eine Interaktion mit TNFα, IL-6, ROS, und Stimuli durch stattfindende Apoptose und Nekrose gelegt, da NF-κB von diesen sowohl aktiviert wird wie auch diese reguliert [67, 110]. Durch Aktivierung der Transkription des EPO und HO-1 Gens wirkt NF-κB jedoch auch antiapoptotisch.

Schlussfolgernd können folgende Aussagen getroffen werden:

1. Sowohl TNFα wie IL-6 waren in beiden Gruppen bereits nach 4 h Reperfusion signifikant erhöht, während der weiteren Stunden zeigte sich kein relevanter Abfall.
2. Bezüglich TNFα, IL-6, IκBa und NF-κB konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Gruppen festgestellt werden.
3. Durch eine Gabe von cEPO konnten kein immummodulatorischer Effekt in diesem Modell nachgewiesen werden.

Dieses Ergebnis korreliert mit einem früheren Experiment zur neuronaler Protektion mit cEPO-Fc am Schwein [104].

4.4 Schutz vor oxidativen und nitrosativen Stress

Eine Nierenischämie führt zur Bildung und Akkumulation von reaktiven Sauerstoff- und Stickstoffspezies (ROS, RNS). Ihre Ursache liegt in der Unterbrechung der mitochondrialen Atmungskette, Induktion von Enzymen wie iNOS und Überlastung der intrazellulären Radikalfänger. In der Reperfusionsphase wird diese Situation erstmals weiter verschlimmert, indem Leukozyten angeschwemmt und aktiviert werden und eine lokale Azidose und Calciumanstieg eine ordnungsgemäße Funktion der Zelle stören.

ROS und RNS sind eng miteinander verknüpft und hohe Konzentrationen führen zu Lipid-, Protein- und DNA-Schäden. Kann die Zellen ihre Integrität nicht aufrechterhalten, führen diese Veränderungen letztendlich zu Apoptose und/oder Nekrose.

In anderen Versuchen wurde bereits gezeigt, dass Organe durch cEPO vor oxidativen Schäden geschützt werden können [16, 104].

4.4.1 Systemischer oxidativer und nitrosativer Stress

Wie bereits erwähnt, führt eine gesteigerte NO-Produktion zu erhöhten Nitrat- und Nitritwerten im Blut. Daraus kann auf Änderungen von NO und auf einen im Organismus

herrschenden erhöhten nitrosativen Stress geschlossen werden. Ähnliches kann über 8-Isoprostane gesagt werden, welche wie bereits beschrieben durch Lipidperoxidation von Zellmembranen entstehen und im Blut detektiert werden können. Beide Gruppen zeigten einen deutlichen Anstieg der beiden Parameter, die Werte blieben in der Reperfusionsphase auf etwa gleich hohem Niveau. Auch hier konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen festgestellt werden.

Das letztere Ergebnis steht im Kontrast zu einem früheren Experiment zur Neuroprotektion nach I/R, in dem ein deutlicher Anstieg der Isoprostane ausblieb [104]. Eine statistische Signifikanz wurde möglicherweise durch eine zu kleine Anzahl an Versuchstieren pro Gruppe nicht erreicht. Außerdem wurde hier eine andere Schweinerasse untersucht.

4.4.2 Oxidativer / nitrosativer Stress und Adaptation der Niere

Einer der Hauptakteure der überschießenden NO-Produktion ist iNOS, welche auch in Nierenzellen nach I/R hoch reguliert wird. Es bilden sich Stickoxidradikale, zusammen mit Superoxid führt dies zur Bildung von Peroxynitrit. Diese Substanz ist in der Lage, Proteine zu modifizieren und sie in ihrer Funktion zu beeinträchtigen. Nitrotyrosin, ein Marker für oxidativen (und nitrosativen) Stress, wird gebildet. Gleichzeitig finden gegenregulatorische Vorgänge in der Zelle statt, um einen erhöhten Radikalaufkommen zu begegnen. Zu diesen Mechanismen gehört auch die Induktion von HO-1, welche bei einer Ischämie über HIF-1 stimuliert wird und als ein Gegenspieler bei hoher iNOS-Aktivität wirkt.

In diesem Experiment wurden diese drei Marker bestimmt. Die Ergebnisse zeigen für iNOS und Nitrotyrosin keine Intergruppendifferenz. Ein signifikanter Unterschied zeigt sich einzig bei HO-1. Diese Beobachtung müsste in anderen Experimenten verifiziert werden, da sie aus den hier gewonnenen Erkenntnissen nicht erklärt werden kann. Rein hypothetisch kann dieses Ergebnis so gedeutet werden, dass HO-1 als ein Stressprotein weniger Induktion in der cEPO Gruppe erfährt, da entweder durch eine extrinsische Gabe von cEPO weniger zellulärer Stress entsteht, oder weniger HO-1 im Sinne eines negativen Feedbacks, z.B. durch Inhibierung von HIF-1α (was in diesem Experiment nicht gezeigt werden konnte) induziert wird.

4.4.3 Detektion von DNA Schäden im Comet Assay

Das Comet Assay als ein etabliertes Verfahren zur Detektion von DNA Strangbrüchen wurde in seiner Alkaliversion sowohl an Vollblutproben wie am Nierengewebe durchgeführt. Die Ergebnisse aus Vollblutproben zeigen ein Tailmoment, das im Laufe des Versuches nicht wesentlich anstieg. Das Tailmoment aus manuell homogenisiertem Nierengewebe vor und nach Okklusion zeigt ein wesentlich höheres Tailmoment um 5 bis

10. Natürlich könnte und müsste eine DNA-Schädigung in der ischämischen Niere viel größer als im Blutkreislauf sein. Während der Durchführung des Assays zeigte sich allerdings, dass durch die manuelle und somit ungleichmäßige Homogenisierung der Proben zu viel Material auf die Objektträger aufgetragen wurde und es fast immer zur Überlagerung von Zellkernen kam. Eine adäquate Auswertung mit Auswahl nach dem Zufallsprinzip war unmöglich und verzerrte die Ergebnisse. Nierenproben, die vor Aortenokklusion gewonnen wurden, mussten aus der Auswertung genommen werden, da das Tailmoment und somit der Schädigungsgrad vor Ischämie scheinbar höher ausfiel als zur Beendigung des Versuches. Die Methode der manuellen Gewebehomogenisierung muss folglich hinterfragt werden. Hier kann gesagt werden, dass ein Comet Assay am Gewebe anders als an Blut geführt werden muss, z.B. durch einen enzymatischen Vorverdau, um gute und verlässliche Resultate zu erzielen. Da beide Gruppen dennoch methodisch gleich behandelt wurde, konnte zumindest gezeigt werden, dass es zu keinem Unterschied in der DNA-Schädigung zwischen den Gruppen kam.

Zusammenfassend kann postuliert werden:

1. Während der Reperfusion kam es in beiden Gruppen zum deutlichen Anstieg der Parameter für oxidativen und nitrosativen Stress, einzig bei HO-1 zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen.
2. Ein positiver Effekt auf DNA-Stangbrüche im Comet Assay konnte nicht beobachtet werden.
3. cEPO zeigte sowohl auf systemischer wie auf zellulärer Ebene keine protektiven Eigenschaften bei oxidativen und nitrosativen Stress in diesem Modell.

4.5 Modulation einer möglichen Apoptose

Apoptose als eine Form des Zelluntergangs wird auf vielen Ebenen kontrolliert und kann immer wieder zu Gunsten eines Zellerhalts unterbrochen werden. Überwiegen jedoch die intrazellulären apoptotischen Signale oder erfährt die Zelle einen permanenten Entzug von Überlebensfaktoren, wozu auch Erythropoetin zählt, verschiebt das Gleichgewicht soweit, dass eine Apoptose nicht mehr verhindert werden kann. Dabei entstehen jedoch kaum Kollateralschäden, anders als bei einer Nekrose, die zur zellulären Disruption mit Freisetzung von Zellorganellen und Zytokinen mit konsekutiver Inflammation führt.

Die komplexen regulatorischen Vorgänge wurden in der Einleitung skizziert, und die für diese Studie relevanten Proteine in ihrer Interaktion in Abb. 1 grafisch dargestellt. Bei den untersuchten antiapoptotischen Proteinen Bcl-XL und XIAP und der proapoptotischen

aktivierten Caspase 3 konnten keine signifikanten Intergruppenunterschiede beobachtet werden, folglich konnte in diesem Modell eine vorteilhafte Modulation der Apoptose durch cEPO nicht nachgewiesen werden.
Eine relevante Nekrose fand sich nur in einem Präparat aus der Kontrollgruppe nach Beendigung des Versuches, deshalb wurde dieser Aspekt nicht weiter verfolgt.

4.6. Nierenprotektion durch Erhalt der zellulären Integrität

Bei einem I/R Schaden sind vor allem proximale Tubuli der juxtamedullären Nephrone betroffen. Eine Erklärung dafür ist die serielle Gefäßschaltung der Niere und der ausgesprochen hohe Sauerstoffbedarf der proximalen Tubulusepithelzellen. Zu den akuten ischämischen Schädigungsmustern gehören Zellödem, Verlust des PAS-positiven Bürstensaums der proximalen Tubulusepithelien, Ablösung von der Basalmembran und Verlust einzelner Epithelzellen, Verschmälerung des Tubulusepithels mit gleichzeitiger Dilatation der Lumina, interstitielles Ödem, Zellexfoliation und Ansammlung von Zell- und Proteindebris im Tubuluslumen (Cast Formation), dadurch bedingte Obstruktion, Einwanderung von mononukleären Zellen, Inflammation, Apoptose und fokale Nekrose [23,73]. Die einzelnen Muster haben unterschiedlich schwerwiegende Folgen für das Gesamtorgan, einige sind reversibel, andere führen zu irreversiblen Zell- und Funktionsverlust. Bei einer Ischämie kommen nicht alle Veränderungen gleichzeitig vor, die Dauer der Ischämie und der Zeitpunkt der Probenentnahme spielen durchaus eine Rolle, wie in der Arbeit von Chien et al. und bei Bonegio et al. beobachtet werden konnte [11, 20]. In dieser Studie konnte vor Beginn der Ischämie eine Biopsie aus der rechten Niere gewonnen werden und mit Nierenproben nach Beendigung des Versuches verglichen werden. Alle Präparate wurden histologisch aufgearbeitet und auf alle oben erwähnten Muster hin untersucht. Folgende Veränderungen konnten tatsächlich beobachtet werden: zytoplasmatisches Ödem, Dilatation der Tubuluslumina und ein Epithelzellverlust. Eindeutig identifizierbare Zeichen einer Apoptose konnten nicht gefunden werden. Es wurden ebenso glomeruläre Veränderungen beobachtet: glomeruläre Tubularisation, Dilatation des Filtrationsraumes und Verdickung des parietalen Epithels der Bowmanschen Kapsel. Das erstgenannte Merkmal wurde bereits vorbeschrieben [49], die beiden letztgenannten wurden im Zusammenhang mit einer akuten Nierenschädigung bis jetzt nicht explizit erwähnt. Zusätzlich wurden noch komplexe Schädigungsmuster beobachtet wie ein interstitielles Ödem mit Auseinanderweichen der Tubuli, Exfoliation und Cast Formation und Bildung von Proteinzylindern mit Vakuolen (höchstwahrscheinlich

Cholesterin im Rahmen der genetisch fixierten Hypercholesterinämie).

Die Ergebnisse zeigen morphologische Korrelate analog zu den bereits erwähnten funktionellen Einschränkungen der Niere (s. Abschnitt 5.2), in vielen Biopsien konnte bereits vor der I/R Sequenz eine mehr oder weniger ausgeprägte Exfoliation und Cast Formation beobachtet werden. Dieses Phänomen war vor allem in den Lumina der proximalen Tubuli zu finden, was auf eine Schrankenstörung des glomerulären Filtrationsapparates im Sinne einer Proteinurie und auf eventuelle intermittierende Durchblutungsstörungen hinweisen könnte. Dazu passend fanden sich auch immer wieder ödematös veränderte Epithelien, wie auch glomeruläre Tubularisation und verdicktes parietales Epithel der Bowmanschen Kapsel im geringen Grade. Makroskopisch zeigten sich fast alle Nieren nach Entnahme kleiner als erwartet, obwohl sie durch die Versuchsprozedur ödematös aufgelockert waren. Dieser Aspekt wurde jedoch nicht explizit untersucht. Eine Gefäßsklerose mit Nierenschrumpfung kann hier vermutet werden.

Nach zweistündiger Ischämie und achtstündiger Reperfusion zeigte sich in beiden Gruppen vor allem eine ausgeprägte Dilatation sowohl der Tubuluslumina wie auch des Kapselraumes der Bowmanschen Kapsel. Eine retrograde Obstruktion kann dennoch ausgeschlossen werden, da die Tiere zügig mit einem suprapubischer Katheter versorgt wurden. Diese Veränderung kann jedoch als potenziell reversibel betrachtet werden. Es zeigte sich außerdem ein Tubulusepithelzellverlust in höheren Grade mit weitaus ernsteren Folgen für das Organ. Alle anderen Merkmale waren entweder nur mäßig ausgeprägt oder zeigten keine Progression nach I/R.

Zusammenfassend kann postuliert werden:

1. Die Tiere zeigten bereits vor Ischämie Zeichen einer Nierenschädigung auf mikroskopischer und makroskopischer Ebene.
2. Signifikante Progression im Laufe des Versuches zeigte sich bei beiden Gruppen in der Dilatation des Bowmanschen Kapselraumes und der Tubuli und im Epithelzellverlust, eine regionale Häufung konnte aber, ebenso wie eine Intergruppendiffenrenz, nicht beobachtet werden.
3. Sich in Apoptose befindende Zellen konnten nicht sicher identifiziert werden.
4. cEPO zeigte in diesem Modell keine Vorteile auf histologischer Ebene.

Als ein Kritikpunkt muss angeführt werden, dass nur ein Bruchteil der gesamten Niere histologisch untersucht werden konnte, weshalb die Ergebnisse nur bedingt repräsentativ sind und sich nur auf die Mittelsektion der Niere beziehen. Falls es zu ausgeprägteren Veränderungen z.B. in den Nierenpolen kam, blieben diese unentdeckt. Der nächste

Kritikpunkt bezieht sich auf den Zeitfaktor. Da diese Schweinerasse noch wenig untersucht ist, gibt es keine Referenzen zu einem „optimalen“ Zeitpunkt, zu dem eine etwaige Apoptose oder Nekrose beobachtet werden kann. Vergleichbare Versuche am deutschen Landschwein zeigten ähnliche Schädigung der Nierenfunktion nach 45 min Ischämie und 4 h Reperfusion [100] und 90 min Ischämie und 8 h Reperfusion [103], eine vergleichbare histologische Aufarbeitung wurde nicht durchgeführt. Andere Studien beziehen sich entweder auf ein anderes Organ (Gehirn, Rückenmark, Herz) oder wurden an Ratten oder Mäusen durchgeführt. Somit besteht die Möglichkeit, dass apoptotische Tubulusepithelzellen nach 8 h Reperfusion bereits eliminiert wurden oder eine Apoptose und Nekrose erst nach Tagen mikroskopisch sichtbar wird.

4.7 Schlussfolgerungen

In dieser Arbeit wurden einige Studien angeführt, die zytoprotektive Eigenschaften von cEPO nachweisen konnten, sei es auf antioxidativer, immunmodulatorischer oder antiapoptotischer Ebene. Diese Ergebnisse sollten am Großtiermodell, mit einem Fokus auf eine etwaige Nierenprotektion, bestätigt werden. Eine spezielle Schweinerasse mit generalisierter Atherosklerose analog zu einem gefäßchirurgischen Patienten wurde hier untersucht. Die Gabe von cEPO erfolgte zweizeitig als Infusion kurz vor Einleitung der Ischämie und während der ersten Stunden der Reperfusionsphase. In diesem Zeitraum entsteht bekanntlich besonders viel oxidativer Stress [20, 112]. Es wurde eine Dosierung gewählt, bei der von einer ausreichenden Wirksamkeit auszugehen ist, wie in einer vorangehenden Studie demonstriert werden konnte [104]. Eine Ischämiezeit von 120 min war notwendig, weil die FBM Schweinerasse wohl träge auf I/R reagiert und bei kürzeren Ischämiezeiten ein vergleichbarer und ausreichender Abfall der GFR nicht erzielt werden konnte. Es wurden Entzündungsparameter, Marker des oxidativen und nitrosativen Stresses, adaptive Vorgänge, Apoptose, Antiapoptose, EPO-R Expression und histologische Veränderungen der Niere untersucht. In diesem Modell konnten jedoch keine vorteilhaften Effekte durch cEPO beobachtet werden.

Es stellt sich die Frage warum trotz überwältigender Mehrheit an positiven Berichten zu Zytoprotektion durch EPO und seinen Derivaten diese Ergebnisse hier nicht reproduziert werden konnten. Die plausibelste Erklärung findet sich in der vergleichenden Untersuchung der EPO-R Expression: die FBM Rasse zeigt um ein vielfaches erniedrigte Rezeptordichte in der Niere. Ein Ansprechen auf eine „Therapie“ mit cEPO ist folglich abgeschwächt oder fehlt ganz.

Ein ähnliches Problem der EPO-Resistenz wurde bereits beobachtet: bei Patienten mit einem chronischen Herzversagen oder Nierenversagen im Endstadium wurden erhöhte inflammatorische Marker wie CRP und IL-6 beobachtet und auch ein erhöhter oxidativer Stress, was wiederum mit einer beschleunigten Atherosklerose und einer erhöhten Mortalität assoziiert ist. Eine derartige chronische Entzündung scheint zu Störungen der EPO und EPO-R Expression, einer verminderten Rezeptorzahl wie auch zu intrazellulären Signalkaskadenstörungen zu führen. Letztendlich entsteht eine EPO-Resistenz, welche selbst ein prognostisch ungünstiger Faktor ist. Durch die Gabe von antioxidativ wirkenden Substanzen konnte das Ansprechen auf eine Therapie mit EPO bei einer chronischen Entzündung verbessert werden [108, 116].

Es würde sich gewiss lohnen, die EPO-R Expression der FBM Rasse noch genauer zu untersuchen, um eine sich im Laufe der Monate manifestierenden Veränderung des EPO-Rezeptors von einem eventuell angeborenen Defekt zu differenzieren und dabei die Expression des EPO-Rezeptor-Heterodimers besonders beleuchten. Auf dieser Ebene könnten die abweichenden Resultate dann gewiss erklärt werden.

Die zu Anfang dieser Arbeit gestellte Frage bezüglich einer renoprotektiven Wirkung von cEPO muss in diesem speziellen Großtiermodell mit einem Nein beantwortet werden. Aufgrund der aus dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse kann eine Empfehlung für den klinischen Einsatz, zumindest bei Patienten mit atherosklerotischen Veränderungen der Gefäße, eingeschränkter Nierenfunktion und erhöhten oxidativen Stress nicht ausgesprochen werden.

Um die andere eingangs gestellte Frage zu klären, wurden zunächst Nierenveränderungen beim Menschen beleuchtet, wie sie z.B. in der Arbeit von Pascual et al. beschrieben sind. Neben einer Reduktion in der Masse wie auch Anzahl der Glomerula kommt es zu einer fokalen Sklerose des Kapillarbäumchens mit Expansion des Mesangiums. Weiter zeigt sich eine Abnahme der Tubuli, Zunahme des Bindengewebes, Verdickung der Basalmembran, Obliteration der afferenten Arteriolen und Abnahme der globalen Nierendurchblutung mit einer sukzessiven Abnahme der glomerulären Filtratiosrate etwa ab dem 30 Lebensjahr. Die so beim älteren Menschen veränderte Niere verliert ihre Fähigkeit der Natriumretention und Regulation der Urinosmolalität. Hypercholesterinämien und Hyperlipoproteinämien erhöhen das Risiko einer Atherosklerose der Nierenarterien. Diese wiederum ist ein wichtiger Faktor für eine verstärkte Glomerulosklerose und weitere Funktionseinbusse [84].

Vergleichbare Veränderungen konnten auch im Rahmen dieser Studie in den Tieren der

FBM Züchtung beobachten werden. Eine eindeutig eingeschränkte glomeruläre Filtrationsleistung und Natriumverlust der Niere war bereits zu Beginn des Versuches vorhanden, eine durch Gefäßsklerose bedingte Nierenschrumpfung kann angenommen werden. In einigen histologischen Schnitten fanden sich fokale segmentale Sklerosen und Verwachsungen des Kapillarbäumchens mit dem parietalen Kapselblatt als chronische Veränderungen der Glomerula. Tubuläre Proteinzylinder mit eingelagerten Fettvakuolen und deutlicher Cholesterinüberstand nach Zentrifugation der Proben deuten auf ein nephrotisches Syndrom der Tiere hin. Das Modell ist also für Untersuchungen auf dem Gebiet der Gefäßchirurgie und anästhesiologischer prä- und intraoperativer Versorgung älterer Patienten mit vorgeschädigter Niere und Gefäßsklerose hoch relevant.

Am Rande soll hier noch NGAL positiv als ein viel versprechender Marker der Nierenschädigung evaluiert werden. Sein Verhalten deckt sich sehr gut mit den bisherigen Ergebnissen der Forschung, sein Einsatz in der Nierenfunktionsdiagnostik ist zu befürworten.

5. Zusammenfassung

Eine einfache, effektive und sichere Renoprotektion bei operativen Eingriffen mit einer unumgänglichen Ischämie des Organs war und ist ein Gegenstand der Forschung. Da ein akutes Nierenversagen und eventuelle Dialyse mit einer deutlich erhöhten Mortalität einhergehen, ist es gerechtfertigt, weiterhin Bemühungen auf diesem Felde zu erbringen. Seit einigen Jahren wird Erythropoetin (EPO) als ein viel versprechender Kandidat gehandelt, vor allem seit seine nichthämatopoetischen Eigenschaften entdeckt und charakterisiert wurden. In klinischen Studien ist der Erfolg jedoch nicht eindeutig, da es auch zu unerwünschten Effekten führen kann, die die Anwendung in Frage stellen. Durch eine chemische Modifikation von rekombinanten EPO scheinen diese Schwierigkeiten jedoch umgänglich. Auch carbamyliertes EPO (cEPO) entwickelt nachweislich seine Wirkung über einen EPO-Rezeptor-Heterodimer, welcher nichthämatopoetische Kaskaden triggert: Zytoprotektion durch Unterdrückung einer Entzündungsantwort, Stimulation von antiapoptotisch wirksamen Signalmolekülen und Schutz vor Sauerstoff- und Stickstoffradikalen durch Verschiebung des Gleichgewichts zu Gunsten zelleigener Radikalfänger. In dieser Arbeit sollte die These einer effektiven Renoprotektion durch carbamyliertes EPO Fusionsprotein (cEPO-Fc) nach Ischämie/Reperfusion untersucht werden. Der Versuch wurde an einer speziellen, sich durch generalisierte Atherosklerose auszeichnenden, Schweinezüchtung durchgeführt und sollte zusätzlich klären, ob Veränderungen der Niere vergleichbar mit einem typischen gefäßchirurgischen Patienten zu finden sind. Für die Studie wurden 14 narkotisierte und maschinell beatmete Schweine der FBM Rasse in eine cEPO-Fc Gruppe und eine Kontrollgruppe randomisiert. Sie bekamen entweder 50 µg/kg Körpergewicht cEPO-Fc oder entsprechende Menge Kochsalzlösung über 30 min verabreicht, unmittelbar gefolgt von einer 120minütigen Ischämiephase durch Ballonokklusion der Aorta. Eine 8stündige Reperfusionsphase folgte. Während den ersten 4 Reperfusionsstunden erfolgte eine nochmalige Infusion von cEPO-Fc oder Kochsalz. Der Blutdruck wurde während der Okklusion mit Hilfe von ATP, Esmolol und Nitroglycerin um 80-120% des Basiswertes gehalten, in der Reperfusionsphase kam Noradrenalin zur Erhaltung präischemischer Blutdruckwerte zum Einsatz. Die Nierenfunktion wurde mit Hilfe von Plasmakreatinin, Kreatininclearance, Neutrophilen Gelatinase-assoziiertes Lipocalin (NGAL) und fraktioneller Natriumexkretion dargestellt, die Stressantwort des Organs mit Hilfe von Nitrotyrosin, iNOS, HO-1 und HIF-1α untersucht. Zur Erfassung einer veränderten Apoptose wurden

XIAP, Bcl-XL und aktivierte Caspase 3 bestimmt. Zusätzlich wurde das Nierengewebe im Comet Assay und histologisch untersucht. Zur Abbildung einer systemischen Stressantwort wurden TNFα, IL-6, Nitrat/Nitrit, 8-Isoprostane, IκBa, NFκB und Vollblut im Comet Assay untersucht. Außerdem wurde die EPO-Rezeptor-Expression in der Niere der FBM Rasse mit der von gesunden Landschweinen verglichen. Bezüglich der perioperativen hämodynamischen Parameter waren beide Gruppen gut vergleichbar. Durch die Ischämie-Reperfusionssequenz konnte eine akute und profunde Nierenfunktionseinbusse nach AKIN und RIFLE Klassifikation bei allen Tieren ohne Gruppenunterschiede induziert werden. Interessanterweise zeigten die meisten Tiere bereits zu Versuchsbeginn eine eingeschränkte Nierenfunktion. Alle systemischen Entzündungs- und Stressmarker zeigten in beiden Gruppen einen vergleichbar deutlichen und zügigen Anstieg, ebenso konnten in der Histologie Zeichen für eine akute glomeruläre und tubuläre Schädigung gefunden werden, eine Intergruppendifferenz zeigte sich aber nicht. Einige dieser Merkmale konnten ebenso in präischemischen Proben gefunden werden. Ein Unterschied in der Modulation der Apoptose oder des oxidativen/nitrosativen Stresses innerhalb der Niere konnte nicht gefunden werden. Einzig auffällig war der Unterschied der EPO-Rezeptor-Dichte: die FBM Rasse zeigte eine signifikant niedrigere Expression.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass eine antiapoptotische, antioxidative/antinitrosative oder antiinflammatorische Wirkung von cEPO-Fc in diesem Modell nicht gezeigt werden konnte. Die Atherosklerose und ein wohl erhöhter oxidativer Stress der FBM Rasse führte jedoch bereits präoperativ zu Veränderungen der Niere und zu einer verminderten EPO-R-Expression mit konsekutiver EPO Resistenz, welche das mangelnde Ansprechen auf eine externe cEPO Gabe sehr gut erklären würde. Die FBM Schweinerasse zeigte durchaus zu einem typischen gefäßchirurgischen Patienten analoge renale Veränderungen.

6. Literaturverzeichnis

1. Ando M, Iwata M, Ozeki Y, Tsuchiya K, Akiba T, Nihei H: Circulating platelet-derived microparticles with procoagulant activity may be a potential cause of thrombosis in uremic patients. Kidney Int 62:1757-1763 (2002)
2. Angeli FS, Amabile N, Burjonroppa S, Shapiro M, Bartlett L, Zhang Y, Virmani R, Chatterjee K, Boyle A, Grossman W, Yeghiazarians Y: Prolonged therapy with erythropoietin is safe and prevents deterioration of left ventricular systolic function in a porcine model of myocardial infarction. J Card Fail 16:579-589 (2010)
3. Arcasoy MO: The non-haematopoetic biological effects of erythropoietin. Br J Haematol 141:14-31 (2008)
4. Ates E, Yalcin AU, Yilmaz S, Koken T, Tokyol C: Protective effect of erythropoietin on renal ischemia and reperfusion injury. ANZ J Surg 75:1100-1105 (2005)
5. Bahlmann FH, Fliser D: Erythropoietin and renoprotection. Curr Opin Nephrol Hypertens 18:15-20 (2009)
6. Baldwin DD, Maynes LN, Berger KA, Desai PJ, Zuppan CW, Zimmerman GJ, Winkielman AM, Sterling TH, Tsai CK, Ruckle HC: Laparoscopic warm renal ischemia in the solitary porcine kidney model. Urology 64:592-597 (2004)
7. Barth E, Bassi G, Maybauer DM, Simon F, Gröger M, Oter S, Speit G, Nguyen CD, Hasel C, Möller P, Wachter U, Vogt JA, Matejovic M, Radermacher P, Calzia E: Effects of ventilation with 100% oxygen during early hyperdynamic porcine fecal peritonitis. Crit Care Med 36:495-503 (2008)
8. Belonje AMS, de Boer RA, Voors AA: Recombinant human EPO treatment: beneficial in chronic kidney disease, chronic heart failure, or both? Cardiovasc Drugs Ther 22:1-2 (2008)
9. Bian K, Davis K, Kuret J, Binder L, Murad F: Nitrotyrosine formation with endotoxin-induced kidney injury detected by immunohistochemistry. Am J Physiol 277:33-40 (1999)
10. Blankensteijn JD, Lindenburg FP, van der Graaf Y, Eikelboom BC: Influence of study design on reported mortality and morbidity rates after abdominal aortic aneurysm repair. Br J Surg 85:1624-1630 (1998)
11. Bonegio R, Lieberthal W: Role of apoptosis in the pathogenesis of acute renal failure. Curr Opin Nephrol Hypertens 11:301-308 (2002)
12. Bouzat P, Francony G, Thomas S, Valable S, Mauconduit F, Fevre MC, Barbier EL,

Bernaudin M, Lahrech H, Payen JF: Reduced brain edema and functional deficits after treatment of diffuse traumatic brain injury by carbamylated erythropoietin derivative. Crit Care Med 39:2099-2105 (2011)

13. Braams R, Vossen V, Lisman BAM, Eikelboom BC: Outcome in patients requiring renal replacement therapy after surgery for ruptured and non-ruptured aneurysm of the abdominal aorta. Eur J Vasc Endovasc Surg 18:323-327 (1999)
14. Brasile L, Green E, Haisch C: Ex vivo resuscitation of kidney after postmortem warm ischemia. ASAIO J 43:M427-M430 (1997)
15. Carattino MD, Cueva F, Zuccollo A, Monti JL, Navarro M, Catanzaro OL: Renal ischemia-induced increase in vascular permeability is limited by hypothermia. Immunopharmacology 43:241–248 (1999)
16. Cassis P, Azzollini N, Solini S, Mister M, Aiello S, Cugini D, Scudeletti P, Gagliardini E, Abbate M, Gallon L, Remuzzi G, Noris M: Both darbepoetin alfa and carbamylated erythropoietin prevent kidney graft dysfunction due to ischemia/reperfusion in rats. Transplantation 92:271-279 (2011)
17. Castaneda MP, Swiatecka-Urban A, Mitsnefes MM, Feuerstein D, Kaskel FJ, Tellis V, Devarajan P: Activation of mitochondrial apoptotic pathways in human renal allografts after ischemia-reperfusion injury. Transplantation 76:50-54 (2003)
18. Chade AR, Zhu XY, Krier JD, Jordan KL, Textor SC, Grande JP, Lerman A, Lerman LO: Endothelial progenitor cells homing and renal repair in experimental renovascular disease. Stem Cells 28:1039-1047 (2010)
19. Chatterjee PK, Patel NSA, Kvale EO, Cuzzocrea S, Brown PAJ, Stewart KN, Mota-Filipe H, Thiemermann C: Inhibition of inducible nitric oxide synthase reduces renal ischemia/reperfusion injury. Kidney Int 61:862-871 (2002)
20. Chien CT, Lee PH, Chen CF, Ma MC, Lai MK, Hsu SM: De novo demonstration and co-localization of free-radical production and apoptosis formation in rat kidney subjected to ischemia/reperfusion. J Am Soc Nephrol 12:973-982 (2001)
21. Choi S, Noh J, Hirose R, Ferell L, Bedolli M, Roberts JP, Niemann CU: Mild hypothermia provides significant protection against ischemia/reperfusion injury in livers of obese and lean rats. Ann Surg 241:470-476 (2005)
22. Coleman TR, Westenfelder C, Tögel FE, Yang Y, Hu Z, Swenson L, Leuvenink HGD, Ploeg RJ, d'Uscio LV, Katusic ZS, Ghezzi P, Zanetti A, Kaushansky K, Fox NE, Cerami A, Brines M: Cytoprotective doses of erythropoietin or carbamylated

erythropoietin have markedly different procoagulant and vasoactive activities. Proc Natl Acad Sci U S A 103:5965-5970 (2006)

23. Cotran RS, Rennke H, Kumar V: Kidney and its collecting system. in Kumar V, Cotran RS, Robbins SL, Robbins Basic Pathology: 7. Auflage. Saunders, Elsevier, Philadelphia. S. 531-533 (2003)
24. Cruz DN, Ricci Z, Ronco C: Clinical review: RIFLE and AKIN – time for reappraisal. Crit Care 13:211 (2009)
25. De Albuquerque dos Santos Abreu L, Kawano PR, Yamamoto H, Damião R, Fugita OEH: Comparative study between trimetazidine and ice slush hypothermia in protection against renal ischemia/reperfusion injury in a porcine model. Int Braz J Urol 37:649-656 (2011)
26. 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)
27. Di Grande A, Giuffrida C, Carpinteri G, Narbone G, Pirrone G, Di Mauro A, Calandra S, Noto P, Le Moli C, Alongi B, Nigro F: Neutrophil gelatinase-associated lipocalin: a novel biomarker for the early diagnosis of acute kidney injury in the emergency department. Eur Rev Med Pharmacol Sci 13:197-200 (2009)
28. Dietrich WD, Atkins CM, Bramlett HM: Protection in animal models of brain and spinal cord injury with mild to moderate hypothermia. J Neurotrauma 26: 301-312 (2009)
29. Doggrell SA: A neuroprotective derivative of erythropoietin that is not erythropoietic. Expert Opin Investig Drugs 13:1517-1519 (2004)
30. Dörner K: Aminosäuren, Proteine und Enzyme. in Klinische Chemie: 5. Auflage. Thieme, Stuttgart, New York S. 106 (2003)
31. Dörner K: Nierendiagnostik. in Klinische Chemie: 5. Auflage. Thieme, Stuttgart, New York S. 438-442, 445-448 (2003)
32. Ehrenreich H, Hasselblatt M, Dembowski C, Cepek L, Lewczuk P, Stiefel M, Rustenbeck HH, Breiter N, Jacob S, Knerlich F, Bohn M, Poser W, Rüther E, Kochen M, Gefeller O, Gleiter C, Wessel TC, De Ryck M, Itri L, Prange H, Cerami A, Brines M, Sirén AL: Erythropoietin therapy for acute stroke is both safe and beneficial. Mol Med 8:495-505 (2002)
33. Ehrenreich H, Weissenborn K, Prange H, Schneider D, Weimar C, Wartenberg K,

Schellinger PD, Bohn M, Becker H, Wegrzyn M, Jähnig P, Herrmann M, Knauth M, Bähr M, Heide W, Wagner A, Schwab S, Reichmann H, Schwendemann G, Dengler R, Kastrup A, Bartels C: Recombinant human erythropoietin in the treatment of acute ischemic stroke. Stroke 40:e647-e656 (2009)

34. Ellenberger C, Schweizer A, Diaper J, Kalangos A, Murith N, Katchatourian G, Panos A, Licker M: Incidence, risk factors and prognosis of changes in serum creatinine early after aortic abdominal surgery. Intensive Care Med 32:1808–1816 (2006)
35. Erbayraktar S, Grasso G, Sfacteria A, Xie Q, Coleman T, Kreilgaard M., Torup L, Sager T, Erbayraktar Z, Gokmen N, Yilmaz O, Ghezzi P, Villa P, Fratelli M, Casagrande S, Leist M, Helboe L, Gerwein J, Christensen S, Aavang Geist M, Østergaard Pedersen L, Cerami-Hand C, Wuerth JP, Cerami A, Brines M: Asialerythropoietin is a nonerythropoetic cytokine with broad neuroprotective activity in vivo. Proc Natl Acad Sci U S A 100:6741-6746 (2003)
36. Fiordaliso F, Chimenti S, Staszewsky L, Bai A, Carlo E, Cuccovillo I, Doni M, Mengozzi M, Tonelli R, Ghezzi P, Coleman T, Brines M, Cerami A, Latini R: A nonerythropoietic derivative of erythropoietin protects the myocardium from ischemia-reperfusion injury. Proc Natl Acad Sci U S A 102: 2046-2051 (2005)
37. Foresti R, Motterlini R: The heme oxygenase pathway and its interaction with nitric oxide in the control of cellular homeostasis. Free Radic Res 31:459-475 (1999)
38. Genc S, Koroglu TF, Genc K: Erythropoietin as a novel neuroprotectant. Restor Neurol Neurosci 22:105-119 (2004)
39. Goedje O, Seebauer T, Peyerl M, Pfeiffer UJ, Reichart B: Hemodynamic monitoring by double-indicator dilution technique in patients after orthotopic heart transplantation. Chest 118:775-781 (2000)
40. Gröger M: Einfluss einer Beatmung mit 100% Sauerstoff auf die Ausbildung von DNA-Strangbrüchen und die Parameter des oxidativen Stresses im Langzeitmodell des septischen Schocks beim Schwein. Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Humanbiologie der medizinischen Fakultät der Universität Ulm (2007)
41. Han WK, Bonventre JV: Biologic markers for the early detection of acute kidney injury. Curr Opin Crit Care 10:476-482 (2004)
42. Hauser B, Fröba G, Bracht H, Sträter J, Chkhouta AB, Vassilev D, Schoaff MJ, Huber-Lang M, Brückner UB, Radermacher P, Schelzig H: Effects of intrarenal administration of the COX-2 inhibitor parecoxib during porcine suprarenal aortic-

cross clamping. Shock 24:476-481 (2005)

43. Hauser B, Barth E, Bassi G, Simon F, Gröger M, Oter S, Speit G, Ploner F, Möller P, Wachter U, Vogt JA, Matejovic M, Calzia E, Georgieff M, Radermacher P, Maybauer DM: Hemodynamic, metabolic, and organ function effects of pure oxygen ventilation during established fecal peritonitis-induced septic shock. Crit Care Med 37:2465-2469 (2009)
44. Hehlgans T, Pfeffer K: The intriguing biology of the tumour necrosis factor/tumour necrosis factor receptor superfamily: players, rules and the games. Immunology 115:1-20 (2005)
45. Heyne N, Kemmner S, Schneider C, Nadalin S, Königsrainer A, Häring HU: Urinary neutrophil gelatinase-associated lipocalin accurately detects acute allograft rejection among Other causes of acute kidney injury in renal allograft recipients. Transplantation, 93:1252-1257 (2012)
46. Huang PS, Tang GJ, Chen CH, Kou YR: Whole-body moderate hypothermia confers protection from wood smoke-induced acute lung injury in rats: the therapeutic window. Crit Care Med 34:1160-1167 (2006)
47. Humphreys MR, Castle EP, Lohse CM, Sebo TJ Leslie KO, Andrews PE: Renal ischemia time in laparoscopic surgery: an experimental study in a porcine model. Int J Urol 16:105- 109 (2009)
48. Imamura R, Okumi M, Isaka Y, Ichimaru N, Moriyama T, Imai E, Nonomura N, Takahara S, Okuyama A: Carbamylated erythropoietin improves angiogenesis and protects the kidneys from ischemia-reperfusion injury. Cell Transplant 17:135-141 (2008)
49. Isaac J, Tögel FE, Westenfelder C: Extent of glomerular tubularization is an indicator of the severity of experimental acute kidney injury in mice. Nephron Exp Nephrol 105:e33-e40 (2007)
50. Jelkmann W: Letters and replies: “O”, erythropoietin carbamoylation versus carbamylation. Nephrol Dial Transplant 23:3033 (2008)
51. Jochmanns I, Lerut E, van Pelt J, Monbaliu D, Pirenne J: Circulating AST, H-FABP, and NGAL are early and accurate biomarkers of graft injury and dysfunction in a preclinical model of kidney transplantation. Ann Surg 254:784-792 (2011)
52. Jones SA: Directing Transition from Innate to Acquired Immunity: Defining a Role for IL-6. J Immunol175:3463-3468 (2005)

53. Kaur H, Halliwell B: Evidence for nitric oxide-mediated oxidative damage in chronic inflammation: nitrotyrosine in serum and synovial fluid from rheumatoid patients. FEBS Lett 350:9-12 (1994)
54. Koetting M, Frotscher C, Minor T: Hypothermic reconditioning after cold storage improves postischemic graft function in isolated porcine kidneys. Transpl Int 23:538–542 (2010)
55. Kuwabara T, Mori K, Mukoyama M, Kasahara M, Yokoi H, Saito Y, Yoshioka T, Ogawa Y, Imamaki H, Kusakabe T, Ebihara K, Omata M, Satoh N, Sugawara A, Barasch J, Nakao K: Urinary neutrophil gelatinase-associated lipocalin levels reflect damage to glomeruli, proximal tubules, and distal nephrons. Kidney Int 75:285-294 (2009)
56. Lapchak PA, Kirkeby A, Zivin JA, Sager TN: Therapeutic window for nonerythropoietic carbamylated-erythropoietin to improve motor function following multiple infarct ischemic strokes in New Zealand white rabbits. Brain Res 1238:208-214 (2008)
57. Laven BA, Orvieto MA, Chuang MS, Ritch CR, Murray P, Harland RC, Inman SR, Brendler CB, Shalhav AL: Renal tolerance to prolonged warm ischemia time in a laparoscopic versus open surgery porcine model. J Urol 172:2471-2474 (2004)
58. Legrand M, Mik EG, Johannes T, Payen D, Ince C: Renal hypoxia and dysoxia after reperfusion of the ischemic kidney. Mol Med 14:502-516 (2008)
59. Leist M, Ghezzi P, Grasso G, Bianchi R, Villa P, Fratelli M, Savino C, Bianchi M, Nielsen J, Gerwien J, Kallunki P, Larsen AK, Helboe L, Christensen S, Pedersen LO, Nielsen M, Torup L, Sager T, Sfacteria A, Erbayraktar S, Erbayraktar Z, Gokmen N, Yilmaz O, Cerami-Hand C, Xie Q, Coleman T, Cerami A, Brines M: Derivatives of erythropoietin that are tissue protective but not erythropoietic. Science 305:239-242 (2004)
60. Maathuis MHJ, Manekeller S, van der Plaats A, Leuvenink HGD, 't Hart NA, Lier AB, Rakhorst G, Ploeg RJ, Minor T: Improved kidney graft function after preservation using a novel hypothermic machine perfusion device. Ann Surg 246:982–991 (2007)
61. Maiese K, Li F, Chong ZZ: New avenues of exploration for erythropoietin. J Am Med Assoc 293:90-95 (2005)
62. Maio R, Sepodes B, Patel NS, Thiemermann C, Mota-Filipe H, Costa P:

Erythropoietin preserves the integrity and quality of organs for transplantation after cardiac death. Shock 35:126-133 (2011)

63. Makris K, Markou N, Evodia E, Dimopoulou E, Drakopoulos I, Ntetsika K, Rizos D, Baltopoulos G, Haliassos A: Urinary neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) as an early marker of acute kidney injury in critically ill multiple trauma patients. Clin Chem Lab Med 47:79-82 (2009)
64. Marinkovic D, Zhang X, Yalcin S, Luciano JP, Brugnara C, Huber T, Ghaffari S: Foxo3 is required for the regulation of oxidative stress in erythropoiesis. J Clin Invest 117:2133-2144 (2007)
65. Mathur VK, Ramsey EW: Comparison of methods for preservation of renal function during ischemic renal surgery. J Urol 129:163-165 (1983)
66. Meylaerts SA, De Haan P, Kalkman CJ, Jaspers J, Vanicky I, Jacobs MJ: Prevention of paraplegia in pigs by selective segmental artery perfusion during aortic cross-clamping. J Vasc Surg 32: 160-170 (2000)
67. Mezzano S, Aros C, Droguett A, Burgos ME, Ardiles L, Flores C, Schneider H, Ruiz-Ortega M, Egido J: NF-κB activation and overexpression of regulated genes in human diabetic nephropathy. Nephrol Dial Transplant 19:2505–2512 (2004)
68. Mitchell RN, Cotran RS: Cell injury, adaptation and death. in Kumar V, Cotran RS, Robbins SL, Robbins Basic Pathology: 7. Auflage. Saunders, Elsevier, Philadelphia. S. 9-10 (2003)
69. Moon C, Krawczyk M, Paik D, Coleman T, Brines M, Juhaszova M, Sollott SJ, Lakatta EG, Talan MI: Erythropoietin modified to not stimulate red blood cell production, retains its cardioprotective properties. J Pharmacol Exp Ther 316: 999-1005 (2006)
70. Moore EM, Nichol AD, Bernard SA, Bellomo R: Therapeutic hypothermia: Benefits, mechanisms and potential clinical applications in neurological, cardiac and kidney injury. Injury 42:843–854 (2011)
71. Morrow JD: The isoprostanes: their quantification as an index of oxidant stress status in vivo. Drug Metab Rev 32:377-385 (2000)
72. Müller M: Arterielle Aneurysmen. in Chirurgie für Studium und Praxis: 8. Auflage. Medizinische Verlag- und Informationsdienste, Breisach. S. 61-64 (2006)
73. Nadasdy T, Racusen LC: Acute Tubular Necrosis and Ischemic Renal Injury. in Jennette JC, Olson JL, Schwartz MM, Silva FG: Heptinstall's Pathology of the

Kidney: 6. Auflage. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, S.863-890 (2006)

74. Najjar SS, Rao SV, Melloni C, Raman SV, Povsic TJ, Melton L, Barsness GW, Prather K, Heitner JF, Kilaru R, Gruberg L, Hasselblad V, Greenbaum AB, Patel M,. Kim RJ, Talan M, Ferrucci L, Longo DL, Lakatta EG, Harrington RA: Intravenous erythropoietin in patients with ST-segment elevation myocardial infarction: REVEAL: a randomized controlled trial. J Am Med Assoc 305:1863-1872 (2011)
75. Nijboer WN, Ottens PJ, van Dijk A, van Goor H, Ploeg RJ, Leuvenink HGD: Donor pretreatment with carbamylated erythropoietin in a brain death model reduces inflammation more effectively than erythropoietin while preserving renal function. Crit Care Med 38:1155-1161 (2010)
76. Nirmalan M, Willard TM, Edwards DJ, Little RA, Dark PM: Estimation of errors in determining intrathoracic blood volume using the single transpulmonary thermal dilution technique in hypovolemic shock. Anesthesiology 103:805-812 (2005)
77. Noiri E, Peresleni T, Miller F, Goligorsky MS: In vivo targeting of inducible NO synthase with oligodeoxynucleotides protects rat kidney against ischemia. J Clin Invest 97:2377-2383 (1996)
78. Noiri E, Nakao A, Uchida K, Tsukahara H, Ohno M, Fujita T, Brodsky S, Goligorsky MS: Oxidative and nitrosative stress in acute renal ischemia. Am J Physiol Renal Physiol 281:F948-957 (2001)
79. Novick AC: Renal hypothermia: in vivo and ex vivo. Urol Clin North Am 10:637-644 (1983)
80. Orvieto MA, Tolhurst SR, Chuang MS, Lyon MB, Ritch CR, Rapp DE, Shalhav AL: Defining the maximal renal tolerance to warm ischemia in porcine laparoscopic and open surgery model. Urology 66:1111-1115 (2005)
81. Orvieto MA, Zorn KC, Lyon MB, Tohurst SR, Rapp DE, Mikhail AA, Oras JJ, Son H, Kasza KE, Brendler CB, Shalhav AL: Laparoscopic Ice Slurry Coolant for Renal Hypothermia. J Urol 177:382-385 (2007)
82. Orvieto MA, Zorn KC, Mendiola F, Lyon MB, Mikhail AA, Gofrit ON, Shalhav AL: Recovery of renal function after complete renal hilar versus artery alone clamping during open and laparoscopic surgery. J Urol 177:2371-2374 (2007)
83. Palnaes H, Bie P, Stadil F: Assessment of renal function by 51Cr-EDTA and endogenous creatinine clearances in the pig. Acta Physiol Scand 161:253-260 (1997)
84. Pascual J, Liano F, Ortuno J: The elderly patient with acute renal failure. J Am Soc

Nephrol 6:144-153 (1995)

85. Patel NSA, Sharples EJ, Cuzzocrea S, Chatterjee PK, Britti D, Yaqoob MM, Thiemermann C: Pretreatment with EPO reduces the injury and dysfunction caused by ischemia/reperfusion in the mouse kidney in vivo. Kidney Int 66:983-989 (2004)
86. Pelkey TJ, Frank RS, Stanley JJ, Frank TS, Zelenock GB, D'Alecy LG: Minimal physiologic temperature variations during renal ischemia alter functional and morphologic outcome. J Vasc Surg 15:619-625 (1992)
87. Remig J, Hirner A: Aneurysmata. in Hirner A, Weise K, Chirurgie Schnitt für Schnitt: 1. Auflage. Thieme, Stuttgart, New York. S. 734-737 (2004)
88. Roberts LJ 2nd, Morrow JD: Products of the isoprostane pathway: unique bioactive compounds and markers of lipid peroxidation. Cell Mol Life Sci 59:808-820 (2002)
89. Sarac TP, Clair DG, Hertzer NR, Greenberg RK, Krajewski LP, O'Hara PJ, Ouriel K: Contemporary results of juxtarenal aneurysm repair. J Vasc Surg 36:1104-1111 (2002)
90. Sarafidis K, Tsepkentzi E, Agakidou E, Diamanti E, Taparkou A, Soubasi V, Papachristou F, Drossou V: Serum and urine acute kidney injury biomarkers in asphyxiated neonates. Pediatr Nephrol 27:1575-1582 (2012)
91. Schinstock CA, Semret MH, Wagner SJ, Borland TM, Bryant SC, Kashani KB, Larson TS, Lieske JC: Urinalysis is more specific and urinary neutrophil gelatinase-associated lipocalin is more sensitive for early detection of acute kidney injury. Nephrol Dial Transplant epublished ahead of print doi:10.1093/ndt/gfs127 (2012)
92. Schirmer HK, Taft JL and Scott WW: Renal metabolism after occlusion of the renal artery and after occlusion of the renal artery and vein. J Urol 96:136 (1966)
93. Schmitz ML, Mattioli I, Buss H, Kracht M: NF-κB: a multifaceted transcription factor regulated at several levels. Chembiochem 5:1348 – 1358 (2004)
94. Schoen FJ, Cotran RS: The blood vessels. in Kumar V, Cotran RS, Robbins SL, Robbins Basic Pathology: 7. Auflage. Saunders, Elsevier, Philadelphia. S. 328-334, 342-343 (2003)
95. Schriebl K, Trummer E, Lattenmayer C, Weik R, Kunert R, Müller D, Katinger H, Vorauer-Uhl K: Biochemical characterization of rhEpo-Fc fusion protein expressed in CHO cells. Protein Expr Purif 49:265-275 (2006)
96. Schrier RW, Wang W, Poole B, Mitra A: Acute renal failure: definitions, diagnosis, pathogenesis and therapy. J Clin Invest 114:5-14 (2004)

97. Sharples EJ, Patel N, Brown P, Stewart K, Mota-Philipe H, Sheaff M, Kieswich J, Allen D, Harwood S, Raftery M, Thiemermann C, Yagoob MM: Erythropoietin protects the kidney against the injury and dysfunction caused by ischemia-reperfusion. J Am Soc Nephrol 15:2115-2124 (2004)
98. Shimoda M, Sawada T, Iwasaki Y, Mori S, Kijima H, Okada T, Kubota K: Erythropoietin strongly protects the liver from ischemia-reperfusion injury in a pig model. Hepatogastroenterology 56:470-475 (2009)
99. Simon F, Giudici R, Duy CN, Schelzig H, Oter S, Gröger M, Wachter U, Vogt J, Speit G, Szabó C, Radermacher P, Calzia E: Hemodynamic and metabolic effects of hydrogen sulfide during porcine ischemia/reperfusion injury. Shock 30:359-364 (2008)
100. Simon F, Scheuerle A, Calzia E, Bassi G, Oter S, Duy CN, Kick J, Brückner UB, Radermacher P, Schelzig H: Erythropoietin during porcine aortic balloon occlusion-induced ischemia/reperfusion injury. Crit Care Med 36:2143-2150 (2008)
101. Simon F, Calzia E, Radermacher P, Schelzig H: Beneficial effects of erythropoietin in models of shock and organ failure – nothing is simple and easy. Shock 31:220-221 (2009)
102. Simon F, Giudici R, Scheuerle A, Gröger M, Asfar P, Vogt JA, Wachter U, Ploner F, Georgieff M, Möller P, Laporte R, Radermacher P, Calzia E, Hauser B: Comparison of cardiac, hepatic, and renal effects of arginine vasopressin and noradrenaline during porcine fecal peritonitis: a randomized controlled trial. Crit Care 13:R113 (2009)
103. Simon F, Scheuerle A, Gröger M, Stahl B, Wachter U, Vogt J, Speit G, Hauser B, Möller P, Calzia E, Szabó C, Schelzig H, Georgieff M, Radermacher P, Wagner F: Effects of intravenous sulfide during porcine aortic occlusion-induced kidney ischemia/reperfusion injury. Shock 35:156-163 (2011)
104. Simon F, Scheuerle A, Gröger M, Vcelar B, McCook O, Möller P, Georgieff M, Calzia E, Radermacher P, Schelzig H: Comparison of carbamylated erythropoietin-Fc fusion protein and recombinant human erythropoietin during porcine aortic balloon occlusion-induced spinal cord ischemia/reperfusion injury. Intensive Care Med 37:1525-1533 (2011)
105. Sølling C, Christensen AT, Krag S, Frøkiaer J, Wogensen L, Krog J, Tønnesen EK: Erythropoietin administration is associated with short-term improvement in glomerular filtration rate after ischemia-reperfusion injury. Acta Anaesthesiol Scand

55:185-195 (2011)

106. Sølling C, Christensen AT, Nygaard U, Krag S, Frøkiaer J, Wogensen L, Krog J, Tønnesen EK: Erythropoietin does not attenuate renal dysfunction or inflammation in a porcine model of endotoxemia. Acta Anaesthesiol Scand 55:411-421 (2011)
107. Speit G, Hartmann A: The comet assay (single-cell gel test). A sensitive genotoxicity test for the detection of DNA damage and repair. Methods Mol Biol 113: 203-212 (1999)
108. Stenvinkel P, Barany P: Anaemia, rHuEPO resistance, and cardiovascular disease in end-stage renal failure: links to inflammation and oxidative stress. Nephrol Dial Transplant 17:32-37 (2002)
109. Suarez CA, Guerrero AA, Musil G, Hulet WH: Renal function and nephron structure in the miniature pig. Am J Vet Res 29:995-1007 (1968)
110. Sun Z, Andersson R: NF-κB activation and inhibition: a review. Shock 18:99–106 (2002)
111. Sundt TM, Flemming MD, Oderich GS, Torres NE, Li Z, Lenoch J, Kalra M: Spinal cord protection during open repair of thoracic and thoracoabdominal aortic aneurysms using profound hypothermia and circulatory arrest. J Am Coll Surg 212:678-683 (2011)
112. Supavekin S, Zhang W, Kucherlapati R, Kaskel FJ, Moore LC, Devarajan P: Differential gene expression following early renal ischemia/reperfusion. Kidney Int 63:1714-1724 (2003)
113. Svensson LG, Crawford ES, Hess KR, Coselli JS, Sail HJ: Experience with 1509 patients undergoing thoracoabdominal aortic operations. J Vasc Surg 17:357-370 (1993)
114. Thim T, Hagensen MK, Drouet L, Bal dit Sollier C, Bonneau M, Granada JF, Nielsen LB, Paaske WP, Bøtker HE, Falk E: Familial hypercholesterolaemic downsized pig with human-like coronary atherosclerosis: a model for preclinical studies. EuroIntervention 5:1-9 (2010)
115. Uttenthal LO: NGAL: how useful is the new marker of kidney damage? Clinical Laboratory International Onlinemagazine: cli-online.com/fileadmin/artimg/ngal-how-useful-is-the-new-marker-of-kidney-damage.pdf (2007)
116. Van der Putten K, Braam B, Jie KE, Gaillard CAJM: Mechanisms of disease: erythropoietin resistance in patients with both heart and kidney failure. Nat Clin Pract

Nephrol 4:47-57 (2008)

117. Vesey DA, Cheung C, Pat B, Endre Z, Gobe G, Johnson DW: Erythropoietin protects against ischaemic acute renal injury. Nephrol Dial Transplant 19:348-355 (2004)
118. Villa P, van Beek J, Larsen AK, Gerwien J, Christensen S, Cerami A, Brines M, Leist M, Ghezzi P, Torup L: Reduced functional deficits, neuroinflammation, and secondary tissue damage after treatment of stroke by nonerythropoietic erythropoietin derivatives. J Cerebr Blood Flow Metab 27:552-563 (2007)
119. Wagner M, Cadetg P, Ruf R, Mazzucchelli L, Ferrari P, Redaelli CA: Heme oxygenase-1 attenuates ischemia/reperfusion-induced apoptosis and improves survival in rat renal allografts. Kidney Int 63:1564-1573 (2003)
120. Waldmann KH, Wendt M, Bickhardt K: Kreatinin-Clearance als Grundlage klinischer Nierenfunktionsbestimmung beim Schwein. Tierarztl Prax 19:373-380 (1991)
121. Ward JP: Determination of the optimum temperature for regional renal hypothermia during temporary renal ischaemia. Br J Urol 47:17-24 (1975)
122. Wendt M, Waldmann KH, Bickhardt K: Vergleichende Untersuchung der Inulin- und Creatinin-Clearance beim Schwein. J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med 37:752-759 (1990)
123. Xiong Y, Mahmood A, Zhang Y, Meng Y, Zhang ZG, Qu C, Sager TN, Chopp M: Effects of posttraumatic carbamylated erythropoietin therapy on reducing lesion volume and hippocampal cell loss, enhancing angiogenesis and neurogenesis, and improving functional outcome in rats following traumatic brain injury. J Neurosurg114:549-559 (2011)
124. Xu K, George I, Klotz S, Hay I, Xydas S, Zhang G, Cerami A, Wang J: Erythropoietin derivate improves left ventricular systolic performance and attenuates left ventricular remodeling in rats with myocardial infarct-induced heart failure. J Cardiovasc Pharmacol 56:506-512 (2010)
125. Xu X, Cao Z, Cao B, Li J, Guo L, Que L, Ha T, Chen Q, Li C, Li Y: Carbamylated erythropoietin protects the myocardium from acute ischemia/reperfusion injury through a PI3K/Akt-dependent mechanism. Surgery 146:506-514 (2009)
126. Yeung KK, Tangelder GJ, Fung WY, Coveliers HME, Hoksbergen AWJ, Van Leeuwen PAM, de Lange-de Klerk ESM, WisselinkW: Open surgical repair of ruptured juxtarenal aortic aneurysms with and without renal cooling: Observations regarding morbidity and mortality. J Vasc Surg 51:551-558 (2010)

127. Zacharias M, Conlon NP, Herbison GP, Sivalingam P, Walker RJ, Hovhannisyan K: Interventions for protecting renal function in the perioperative period. Cochrane Database of Systematic Reviews 4:CD003590 (2008)
128. Zager RA, Altschuld R: Body temperature: an important determinant of the severity of ischemic renal injury. Am J Physiol Renal Physiol 251:F87-F93 (1986)
129. Zager RA, Gmur DJ, Bredl CR, Eng MJ: Degree and time sequence of hypothermic protection against experimental ischemic acute renal failure. Circ Res 65:1263-1269 (1989)