

## Abstract

Das akute Nierenversagen ist charakterisiert durch eine rasche Reduktion der Nierenfunktion. Die bei weitem häufigste Ursache des akuten Nierenversagens ist der durch unzureichende Perfusion der Niere (Ischämie) hervorgerufene Sauerstoffmangel (Hypoxie). Hierbei wird der proximale Tubulus am schwersten geschädigt. Es besteht ein Zusammenhang zwischen der Dauer der Funktionseinschränkung und dem Verlauf der Erkrankung. Dadurch wird die Regeneration des proximalen Tubulus beim akuten Nierenversagen zum entscheidenden Schritt zur Wiederherstellung der Nierenfunktion und damit zum Überleben des Patienten. Diese Regeneration ist von verschiedenen Faktoren abhängig: Vom Schweregrad der Hypoxie, von der Anzahl intakter Zellen nach der Hypoxie, von der Regeneration sublethal geschädigter Zellen, und der Proliferation der überlebenden Zellen um die irreversibel geschädigten oder abgelösten Zellen zu ersetzen. Alle diese Faktoren wurden in der vorliegenden Arbeit untersucht!

Eine zentrale Bedeutung für die hypoxische Schädigung des proximalen Tubulus wird dem Anstieg der freien intrazellulären Calciumkonzentration zugeschrieben. Jedoch war in der Vergangenheit unklar, unter welchen Bedingungen es bei Hypoxie zu einem frühen reversiblen Anstieg der freien intrazellulären Calciumkonzentration kommt. In der vorliegenden Arbeit wurde die freie intrazelluläre Calciumkonzentration durch ein digitales Bildverarbeitungssystem mit dem calciumsensitiven Fluoreszenzindikator Fura-2 bestimmt. Als Maß für die Hypoxie-induzierten funktionellen Änderungen wurde der Anstieg der Nicotinamiddinucleotid (NADH)-assoziierten-Autofluoreszenz bestimmt. Strukturelle Schädigungen wurden mit dem Fluoreszenzfarbstoff Propidium-Jodid nachgewiesen. Dazu wurden im Vorfeld eine Reihe methodischer Entwicklungen durchgeführt: Erstens die Konstruktion einer Perfusionskammer, die eine schnelle Variation des Sauerstoffpartialdruckes bei gleichbleibender Metabolitenkonzentration erlaubte und die Integration eines Sauerstoffmeßsystems in diese Kammer. Zweitens die Konstruktion eines geeigneten digitalen Bildverarbeitungssystems, das durch Integration eines motorisierten Mikroskoptisches in der Lage ist, eine aussagefähige Anzahl proximaler Tubuli zu untersuchen. Die vorliegende Untersuchung charakterisiert in Abhängigkeit vom Sauerstoffpartialdruck zwei verschiedene Schweregrade der Hypoxie. Bei einem Sauerstoffpartialdruck zwischen 30 und 15 mmHg kommt es zu funktionellen, d.h. Anstieg der NADH-assoziierten Autofluoreszenz und strukturellen Schädigungen, nicht jedoch zu einem Anstieg der freien intrazellulären Calciumkonzentration. Im Gegensatz dazu kommt es bei einem Sauerstoffpartialdruck unter 15 mmHg zusätzlich zu einem Anstieg der freien intrazellulären Calciumkonzentration.

Eine möglichst große Anzahl überlebender Zellen kann durch die Verwendung protektiver Substanzen erreicht werden. Untersucht wurde der Einfluß von Adenosin-Triphosphat (ATP) und Quercetin auf frisch isolierte proximale Tubuli. Beide Substanzen wiesen in der Vergangenheit eine protektive Wirkung auf, ohne daß der Wirkmechanismus weiter aufgeklärt wurde. Hierfür wurde die Laktatdehydrogenase- (LDH) Freisetzung, der zelluläre Kalium-Gehalt und die Malondialdehyd-Bildung bei Hypoxie untersucht. ATP wirkt sowohl in vivo als auch in vitro protektiv gegenüber der Hypoxie induzierten Zellschädigung. Hierfür wurde in der Vergangenheit die These aufgestellt, daß Abbauprodukte des ATP wie ADP und AMP für die protektive Wirkung verantwortlich sind. Da AMP in der vorliegenden Untersuchung keinerlei protektive Wirkung aufwies, ATP jedoch zu einem Rezeptor-typischen Anstieg der freien intrazellulären Calciumkonzentration führte kann der Schluß gezogen werden, daß die protektive Wirkung von ATP Rezeptor-vermittelt ist. Quercetin ist ein Bioflavonoid mit antioxidativen Eigenschaften, das sich in der Vergangenheit bei Ischämie und Reperfusion in der Rattenniere als protektiv erwies. Untersuchungen an kultivierten Nierenzellen wiesen auf einen Zusammenhang der protektiven Wirkung von Quercetin mit einer Hemmung der Lipidperoxydation hin. Die vorliegenden Untersuchungen belegen, daß die Wirkung von Quercetin zumindest teilweise auf einer Hemmung der bei einer Hypoxie vorkommenden Lipidperoxydation beruht.

Die Regeneration proximaler Tubuluszellen im Anschluß an eine hypoxische Schädigung wurden in kultivierten proximalen Tubuluszellen (LLC-PK<sub>1</sub>-Zellen) anhand des Schlüsselenzyms der Wachstumsregulation, der Mitogen-aktivierten Kinase (MAP-Kinase) untersucht. Hypoxie wurde durch eine ATP-Depletion durch Hemmung der mitochondrialen Atmungskette und die Erholung durch Substrat-Substitution simuliert. Untersucht wurde der Einfluß des Epidermalen-Wachstums-Faktors (EGF) und ATP. Sowohl EGF als auch ATP haben in der Vergangenheit zu einer beschleunigten Regeneration im Anschluß an eine hypoxische Schädigung geführt. Dies führte zu der These, daß die regenerative Wirkung von EGF und ATP auf einer verstärkten Proliferation im Anschluß an eine Aktivierung des MAP-Kinase-Signaltransduktionsweges beruhen könnte. Diese These kann durch die vorliegenden Untersuchungen nicht bestätigt werden. Tatsächlich führt die Erholung im Anschluß an eine ATP-Depletion alleine zu einer Aktivierung des MAP-Kinase-Signaltransduktionsweges. Diese Aktivierung läßt sich weder durch EGF noch durch ATP verstärken. Die Proliferation proximaler Tubuluszellen beim akuten Nierenversagen wurde an kultivierten proximalen Tubuluszellen (OK-Zellen) anhand der MAP-Kinase, der c-AMP-Akkumulation und des [<sup>3</sup>H]-Thymidin-Einbaus untersucht. Während die Aktivierung der MAP-Kinase durch klassische Wachstumsfaktoren wie EGF gut untersucht ist, ist der Einfluß anderer Faktoren wie Katecholamine, die beim akuten Nierenversagen ausgeschüttet werden, sowie ihr Einfluß auf die Proliferation proximaler Tubuluszellen weniger gut bekannt. Die vorliegenden Untersuchungen belegen, daß Adrenalin die MAP-Kinase in OK-Zellen durch  $\alpha_2$ -Adrenoceptoren über Pertussistoxin-sensitive-G-Proteine stimuliert. Hierbei kommt es zu einem Abfall des zyklischen-Adenosin Monophosphat (cAMP) und der Proteinkinase C. Als Folge kommt es zu einer verstärkten zellulären Proliferation. Dies weist darauf hin, daß Katecholamine, die während des akuten Nierenversagens ausgeschüttet werden, an der tubulären Regeneration beteiligt sein können.

