

**Aus der Abteilung Nephrologie
(Leiter: Prof. Dr. H. Haller)
im Zentrum Innere Medizin
der Medizinischen Hochschule Hannover**

**Oxidativer Streß bei Hyperlipidämie - induzierter
Nierenschädigung
Untersuchungen zur oxidativ / antioxidativen
Balance**

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin in
der Medizinischen Hochschule Hannover

vorgelegt von
Hartmut Scheuer
aus Biedenkopf

2007

Angenommen vom Senat der Medizinischen Hochschule Hannover

am 15.10.2007.

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Hochschule Hannover

Präsident: Prof. Dr. Dieter Bitter-Suermann

Betreuer der Arbeit: Prof. Dr. Wilfried Gwinner

Referent: PD Dr. med. Ulf Landmesser

Korreferent: PD Dr. med. Matthias Bahr

Tag der mündlichen Prüfung: 15.10.2007

Promotionsausschussmitglieder:

Prof. Dr. med. Alexander Kapp

Prof. Dr. med. Stefan Kubicka

Prof. Dr. med. Burkhard Wippermann

Inhaltsverzeichnis

I. Danksagungen	I
II. Abkürzungen	II
III. Abbildungen, Tabellen und Tafeln	III
1. Einleitung	1
1.1. Hyperlipidämie und Nierenerkrankungen	1
1.2. Oxidative Schädigung bei Nierenerkrankungen mit Hyperlipidämie	3
1.3. Reaktive Sauerstoffspezies und ihre Effekte in biologischen Systemen	5
1.4. Ziele der Arbeit	8
2. Methoden	9
2.1. Experimenteller Aufbau	9
2.1.1. Versuche zur chronischen Hyperlipidämie	9
2.1.2. Versuche zur kurzzeitigen Hyperlipidämie	9
2.1.3. Untersuchungen im nephrotischen Syndrom	11
2.2. Tierhaltung und Handhabung	12
2.2.1. Allgemein	12
2.2.2. Blutdruckmessung	12
2.2.3. Urinsammlung	12
2.3. Organentnahme und Präparation der Gewebe	13
2.3.1. Verwendete Puffer	13
2.3.1.1. Krebs-Henseleit-Saline	13
2.3.1.2. Krebs-Ringer	13
2.3.1.3. Kalium-Phosphat-Puffer	13
2.3.2. Organentnahme	14
2.3.3. Präparation der Glomerula und des tubulointerstitiellen Gewebes	14
2.3.4. Isolierung proximaler Tubuli	15
2.4. Histomorphologische Untersuchungen	16
2.4.1. Glomeruläre Schädigung	16
2.4.2. Interstitielle Schädigung und Zellzahl	18
2.5. Immunhistochemische Untersuchungen	19
2.5.1. Infiltration mit Monozyten / Makrophagen	19
2.5.2. Beurteilung der Zellproliferation	20
2.6. Klinische Chemie	22
2.7. Proteinbestimmung	22
2.8. Proteinbestimmung in Gegenwart von Triton X 100	23

2.9.	Messung reaktiver Sauerstoffspezies im Gewebe	24
2.10.	Bestimmung der Aktivität der oxidativen Enzyme	26
2.10.1.	Xanthinoxidase Aktivität	26
2.10.2.	NADH- und NADPH-Oxidase Aktivitäten	27
2.11.	Bestimmung der Aktivitäten der antioxidativen Enzyme	28
2.11.1.	Catalaseaktivität	28
2.11.2.	Glutathionperoxidaseaktivität	29
2.11.3.	Superoxiddismutase-Aktivität	31
2.12.	Statistische Auswertung	33
3.	Ergebnisse	34
3.1.	Untersuchungen zur chronischen Hyperlipidämie	34
3.1.1.	Basisparameter	34
3.1.2.	Histologische Untersuchungen	36
3.1.3.	Reaktive Sauerstoffspezies in Glomerula	41
3.1.4.	oxidative und antioxidative Enzyme in Glomerula	42
3.1.5.	Reaktive Sauerstoffspezies im Tubulointerstitium	44
3.1.6.	oxidative und antioxidative Enzyme im Tubulointerstitium	45
3.1.7.	Zusammenfassung 1	48
3.2.	Untersuchungen zur kurzfristigen Hyperlipidämie und zur Adriamycin-Nephropathie	49
3.2.1.	Basisparameter	49
3.2.2.	Histologische Untersuchungen	52
3.2.3.	Reaktive Sauerstoffspezies im Tubulointerstitium und in proximalen Tubuli	57
3.2.4.	Wasserstoffperoxid im Tubulointerstitium und in proximalen Tubuli	61
3.2.5.	oxidative und antioxidative Enzyme im Tubulointerstitium und in proximalen Tubuli	62
3.2.6.	Zusammenfassung 2	69
4.	Diskussion	70
4.1.	Experimente mit diätetisch induzierter Hyperlipidämie	70
4.1.1.	Klinische Chemie und Basisparameter	70
4.1.2.	Histologische Untersuchungen	72
4.1.3.	Reaktive Sauerstoffspezies bei Hyperlipidämie	74
4.1.4.	Antioxidative Enzyme bei Hyperlipidämie	77
4.1.5.	Bedeutung der Xanthinoxidase bei Hyperlipidämie	79
4.2.	Adriamycin-Nephropathie und ROS	80
5.	Zusammenfassung	83
6.	Literatur	84

I. Danksagungen

Herrn Prof. Dr. W. Gwinner danke ich für die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe, die Betreuung der Arbeit und stets konstruktive Kritik.

Herrn Prof. H. Haller danke ich für die Geduld, die er bis zur Fertigstellung dieser Arbeit aufgebracht hat und das angenehme Arbeitsklima in seiner Abteilung.

Herrn Prof. Dr. H.-J. Gröne danke ich für die Initiation der Arbeit und die Betreuung und Beratung in allen histopathologischen Fragestellungen.

Dr. Ralf P. Brandes danke ich dafür, mir seine Software zur Registrierung und Auswertung der Chemilumineszenzmessungen zur Verfügung gestellt zu haben, sowie für manchen Hinweis zur Methode.

Frau Elisabeth Gutjahr danke ich herzlich für die tatkräftige und außerordentlich kompetente Unterstützung bei der Durchführung der Experimente. Ihr verdanke ich manchen guten Tip und sie hat meine schlechte Laune nach etlichen mißlungenen Versuchen mehr als geduldig ertragen.

Frau Claudia Schmidt danke ich für die Anfertigung hervorragender histologischer Schnitte und Färbungen, ohne die eine aussagekräftige Beurteilung der Morphologie unmöglich ist.

Meinen Eltern, die leider die Fertigstellung der Arbeit nicht mehr erlebt haben, danke ich für die stetige Unterstützung, Geduld und das unendliche Vertrauen, das mir das Studium überhaupt erst ermöglicht hat.

Meiner Frau Ina und meinen beiden Kindern danke ich für die Entbindung von manchen Verpflichtungen und die Geduld, die sie während mancher Phasen mit schlechter Laune aufgebracht haben.

II. Abkürzungen:

APAAP	Alkalische Phosphatase Anti-Alkalische Phosphatase Komplex
APES	3 Aminopropyltriethoxy-silane
BrdU	5-Bromo-2'-deoxy-Uridine
BSA	Bovines Serum Albumin
BME	β -Mercaptoethanol
CL	Chemilumineszenz
cpm	„counts per minute“
DAB	3,3' Diaminobenzidine tetrahydrochloride dihydrate
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglycoltetraessigsäure
GPX	Glutathionperoxidase
GSH	(red.) Glutathion
GS-SG	(oxid.) Glutathion
KHS	Krebs-Henseleit-Saline
LCAT	Lecithin Cholesterin Acyl Transferase
LDL	Low Density Lipoprotein
oxLDL	oxidativ modifizierte LDL
MEM	Dulbecco's Minimal Essential Medium for Chemiluminescence
PAS	Periodsäure-Schiff's Reagenz
PBS	Phosphate buffered Saline
ROS	Reactive Oxygen Species
XO	Xanthinoxidase
SOD	Superoxiddismutase
TBH	tert-butyl-Hydroperoxid
TIS	Tubulointerstitium

III. Abbildungen, Tabellen und Tafeln

Abbildung 1: <i>Schema der wichtigsten Reaktionen von ROS</i>	6
Abbildung 2: <i>Reaktionsschema bei der Bestimmung der Glutathionperoxidaseaktivität</i>	29
Abbildung 3: <i>Eiweißausscheidung im 24 h Sammelurin bei normal oder cholesterin- und triglyceridreich ernährten uninephrektomierten Wistar-Ratten im chronischen Experiment</i>	35
Abbildung 4: <i>Das kortikale Interstitium infiltrierende Monozyten / Makrophagen bei normal oder cholesterin- und triglyceridreich ernährten uninephrektomierten Wistar-Ratten im chronischen Experiment</i>	40
Abbildung 5 a, b: <i>ROS gemessen als Luminol- (a) oder Lucigenin-vermittelte (b) Chemilumineszenz in frisch isolierten Glomerula von normal oder cholesterin- und triglyceridreich ernährten uninephrektomierten Wistar-Ratten im chronischen Experiment.</i>	41
Abbildung 6: <i>Xanthinoxidaseaktivität in isolierten Glomerula von normal oder cholesterin- und triglyceridreich ernährten uninephrektomierten Wistar-Ratten im chronischen Experiment.</i>	42
Abbildung 7 a, b: <i>ROS gemessen als Luminol- (a) oder Lucigenin-vermittelte (b) Chemilumineszenz in frisch isoliertem tubulointerstitiellem Nierengewebe von normal oder cholesterin- und triglyceridreich ernährten Wistar-Ratten im chronischen Experiment</i>	44
Abbildung 8: <i>Xanthinoxidaseaktivität in isoliertem tubulointerstitiellem Nierengewebe von normal oder cholesterin- und triglyceridreich ernährten uninephrektomierten Wistar-Ratten im chronischen Experiment</i>	45
Abbildung 9 a, b: <i>Aktivität der Catalase (a) und Glutathionperoxidase (b) in isoliertem tubulointerstitiellem Nierengewebe von normal oder cholesterin- und triglyceridreich ernährten Wistar-Ratten im chronischen Experiment</i>	47
Abbildung 10 a, b: <i>Das kortikale Tubulointerstitium infiltrierende Monozyten / Makrophagen in Nieren von Tieren mit diätetisch induzierter Hyperlipidämie sowie mit inhibierter Xanthinoxidaseaktivität (a) und in Tieren mit Adriamycin-Nephropathie (b)</i>	52
Abbildung 11 a, b: <i>Die Glomerula infiltrierende Monozyten / Makrophagen in Nieren von Tieren mit diätetisch induzierter Hyperlipidämie sowie mit inhibierter Xanthinoxidaseaktivität (a) und in Tieren mit Adriamycin-Nephropathie (b)</i>	53
Abbildung 12 a, b: <i>Reaktive Sauerstoffspezies in tubulointerstitiellem Gewebe gemessen als Luminol- vermittelte Chemilumineszenz in Nieren von Tieren mit diätetisch induzierter Hyperlipidämie (a) oder Adriamycin – Nephropathie (b).</i>	58

- Abbildung 13 a, b:** 58
Reaktive Sauerstoffspezies in tubulointerstitiellem Gewebe gemessen als Lucigenin- vermittelte Chemilumineszenz in Nieren von Tieren mit diätetisch induzierter Hyperlipidämie (a) oder Adriamycin – Nephropathie (b).
- Abbildung 14 a, b:** 60
Reaktive Sauerstoffspezies in proximalen Tubuli gemessen als Luminol - vermittelte Chemilumineszenz in Nieren von Tieren mit diätetisch induzierter Hyperlipidämie(a) oder Adriamycin – Nephropathie (b).
- Abbildung 15 a, b:** 60
Reaktive Sauerstoffspezies in proximalen Tubuli gemessen als Lucigenin - vermittelte Chemilumineszenz in Nieren von Tieren mit diätetisch induzierter Hyperlipidämie(a) oder Adriamycin – Nephropathie(b).
- Abbildung 16 a, b:** 62
Xanthinoxidaseaktivität im renalen Tubulointerstitium von Tieren mit diätetisch induzierter Hyperlipidämie (a) oder Adriamycin – Nephropathie (b)
- Abbildung 17 a, b:** 62
Xanthinoxidaseaktivität in renalen proximalen Tubuli von Tieren mit diätetisch induzierter Hyperlipidämie (a) oder Adriamycin – Nephropathie (b)
- Abbildung 18 a, b:** 64
NADPH-Oxidaseaktivität in Gewebehomogenaten aus renalem Tubulointerstitium von Tieren mit diätetisch induzierter Hyperlipidämie (a) oder Adriamycin – Nephropathie (b)
- Abbildung 19 a, b:** 64
NADPH-Oxidaseaktivität gemessen in Gewebehomogenaten aus renalen proximalen Tubuli von Tieren mit diätetisch induzierter Hyperlipidämie (a) oder Adriamycin – Nephropathie (b)
- Abbildung 20 a, b:** 65
Gesamt-SOD-Aktivität gemessen in Gewebehomogenaten aus renalem tubulointerstitiellem Gewebe von Tieren mit diätetisch induzierter Hyperlipidämie (a) oder Adriamycin – Nephropathie (b)
- Abbildung 21 a, b:** 65
Gesamt-SOD-Aktivität gemessen in Gewebehomogenaten aus renalen proximalen Tubuli von Tieren mit diätetisch induzierter Hyperlipidämie (a) oder Adriamycin – Nephropathie (b)
- Abbildung 22 a, b:** 68
Glutathionperoxidaseaktivität in Gewebehomogenaten aus renalem tubulointerstitiellem Gewebe von Tieren mit diätetisch induzierter Hyperlipidämie (a) oder Adriamycin – Nephropathie (b)
- Abbildung 23 a, b:** 68
Glutathionperoxidaseaktivität in Gewebehomogenaten aus renalen proximalen Tubuli von Tieren mit diätetisch induzierter Hyperlipidämie (a) oder Adriamycin – Nephropathie (b)

Tabelle 1: <i>Zusammensetzung des Futters</i>	9
Tabelle 2: <i>Übersicht über den experimentellen Aufbau</i>	11
Tabelle 3 a, b: <i>Allgemeine klinische und klinisch-chemische Parameter bei normal oder cholesterin- und triglyceridreich ernährten uninephrektomierten Wistar-Ratten im chronischen Experiment</i>	34
Tabelle 4 a, b: <i>Glomeruläre Histopathologie bei normal oder cholesterin- und triglyceridreich ernährten uninephrektomierten Wistar-Ratten im chronischen Experiment</i>	36
Tabelle 5: <i>Interstitielle Veränderungen in Nieren von normal oder cholesterin- und triglyceridreich ernährten uninephrektomierten Wistar-Ratten im chronischen Experiment</i>	38
Tabelle 6: <i>Aktivität von NADH- und NADPH-Oxidase in isolierten Glomerula von normal oder cholesterin- und triglyceridreich ernährten uninephrektomierten Wistar-Ratten im chronischen Experiment</i>	42
Tabelle 7 a, b: <i>Antioxidative Enzyme in isolierten Glomerula von normal oder cholesterin- und triglyceridreich ernährten uninephrektomierten Wistar-Ratten im chronischen Experiment</i>	43
Tabelle 8: <i>Aktivität von NADH- und NADPH-Oxidase in tubulointerstitiellem Nierengewebe von normal oder cholesterin- und triglyceridreich ernährten uninephrektomierten Wistar-Ratten</i>	46
Tabelle 9: <i>Superoxiddismutaseaktivitäten in tubulointerstitiellem Nierengewebe von normal oder cholesterin- und triglyceridreich ernährten Wistar-Ratten</i>	46
Tabelle 10 a, b: <i>Serum-Kreatinin von Tieren mit diätetisch induzierter Hyperlipidämie und mit inhibierter Xanthinoxidaseaktivität (a), sowie Tieren mit Adriamycin-Nephropathie (b)</i>	50
Tabelle 11 a, b: <i>Proteinurie von Tieren mit diätetisch induzierter Hyperlipidämie und mit inhibierter Xanthinoxidaseaktivität (a), sowie Tieren mit Adriamycin-Nephropathie (b)</i>	50
Tabelle 12 a, b: <i>Serumcholesterin von Tieren mit diätetisch induzierter Hyperlipidämie und inhibierter Xanthinoxidaseaktivität (a), sowie Tieren mit Adriamycin-Nephropathie (b)</i>	51
Tabelle 13 a, b: <i>Serumtriglyceride von Tieren mit diätetisch induzierter Hyperlipidämie und inhibierter Xanthinoxidaseaktivität (a), sowie Tieren mit Adriamycin-Nephropathie (b)</i>	51
Tabelle 14 a, b: <i>Bromdeoxyuridin - markierte interstitielle Zellen in Nieren von Tieren mit diätetisch induzierter Hyperlipidämie(a) oder Adriamycin-Nephropathie (b)</i>	55

Tabelle 15 a, b:	55
<i>Bromdeoxyuridin - markierte Tubuluszellen in Nieren von Tieren mit diätetisch induzierter Hyperlipidämie(a) oder Adriamycin-Nephropathie (b)</i>	
Tabelle 16 a, b:	61
<i>Meerrettichperoxidase (HRP) getriggerte Chemilumineszenz im Tubulointerstitium als Nachweis von Wasserstoffperoxid in Nieren von Tieren mit diätetisch induzierter Hyperlipidämie(a) oder Adriamycin – Nephropathie (b).</i>	
Tabelle 17 a, b:	61
<i>Meerrettichperoxidase (HRP) getriggerte Chemilumineszenz im proximalen Tubuli als Nachweis von Wasserstoffperoxid in Nieren von Tieren mit diätetisch induzierter Hyperlipidämie(a) oder Adriamycin – Nephropathie (b).</i>	
Tabelle 18 a, b:	63
<i>NADH-Oxidaseaktivität gemessen in Gewebehomogenaten aus renalem Tubulointerstitium von Tieren mit diätetisch induzierter Hyperlipidämie (a) oder Adriamycin – Nephropathie (b)</i>	
Tabelle 19 a, b:	63
<i>NADH-Oxidaseaktivität gemessen in Gewebehomogenaten aus renalen proximalen Tubuli von Tieren mit diätetisch induzierter Hyperlipidämie (a) oder Adriamycin – Nephropathie (b)</i>	
Tabelle 20 a, b:	66
<i>MnSOD-Aktivität gemessen in Gewebehomogenaten aus renalem tubulointerstitiellem Gewebe von Tieren mit diätetisch induzierter Hyperlipidämie (a) oder Adriamycin – Nephropathie (b)</i>	
Tabelle 21 a, b:	66
<i>MnSOD-Aktivität gemessen in Gewebehomogenaten aus renalen proximalen Tubuli von Tieren mit diätetisch induzierter Hyperlipidämie (a) oder Adriamycin – Nephropathie (b)</i>	
Tabelle 22 a, b:	67
<i>Catalaseaktivität gemessen in Gewebehomogenaten aus renalem tubulointerstitiellem Gewebe von Tieren mit diätetisch induzierter Hyperlipidämie (a) oder Adriamycin – Nephropathie (b)</i>	
Tabelle 23 a, b:	67
<i>Catalaseaktivität gemessen in Gewebehomogenaten aus renalen proximalen Tubuli Gewebe von Tieren mit diätetisch induzierter Hyperlipidämie (a) oder Adriamycin – Nephropathie (b)</i>	

Tafel 1 a - d, Glomeruläre Histopathologie 37

Glomeruläre Veränderungen bei männlichen uninephrektomierten Wistar-Ratten nach 150 Tagen cholesterin- und triglyceridreicher Ernährung (PAS-Färbung, 400fache Vergrößerung)

- a) normales Glomerulum von einem einseitig nephrektomierten Kontrolltier,*
- b) deutliche Zeichen einer Verbreiterung des Mesangiums und mesangiale Zellvermehrung (siehe Pfeile),*
- c) segmentale glomeruläre Sklerose (Pfeil),*
- d) Vakuolisierung der Podozyten mit Proteintröpfchen (vergl. Ausschnittsvergrößerung).*

Tafel 2 a, b: Tubulointerstitielle Veränderungen 39

Gegenüber Kontrolltieren (a) zeigten Tiere nach 150 Tagen chronischer Hyperlipidämie (b) ausgeprägte tubulointerstitielle Veränderungen mit atrophischen Tubuli (Pfeil), interstitieller Matrixvermehrung (°) und einem schüttereren interstitiellen Infiltrat sowie perivascular dichten Rundzellinfiltrationen (). Die zugehörigen Glomerula wiesen zum Teil fokale segmentale Vernarbungen auf (siehe auch Tafel 1).*

Tafel 3: Interstitielle infiltrierende Monozyten / Makrophagen 54

Gegenüber den Kontrolltieren (a) zeigten Tiere nach 35 Tagen Fettdiät (b) ein vermehrtes interstitielles Infiltrat mit Monozyten / Makrophagen. Bei Tieren mit Adriamycin-Nephropathie (c) war ebenfalls ein deutliches Infiltrat vorhanden. In Tieren mit Fettdiät und Wolfram-Behandlung (d) fanden sich demgegenüber nur einzelne Monozyten / Makrophagen.

Tafel 4 a, b: Tubuläre proliferierende Zellen 56

Tubuläre Proliferation wurde durch immunhistochemischen Nachweis von 24 h vor Organentnahme injiziertem Bromdeoxyuridin gezeigt. Tiere mit Adriamycin - Nephropathie (b) zeigten gegenüber Kontrolltieren (a) eine deutlich größere Zahl Bromdeoxyuridin-markierter Tubulusepithelzellen.

1. Einleitung

1.1 Hyperlipidämie und Nierenerkrankungen

Die Vorstellung, daß Fettstoffwechselstörungen mit renalen Veränderungen vergesellschaftet sein können, ist alt. Schon im Jahre 1860 beschrieb Rudolph Virchow eine "fettige Degeneration" in den Nieren von Patienten mit „Bright's Disease", einer alten Bezeichnung für Nierenerkrankungen, die mit schwerer Proteinurie einhergehen (Virchow 1860). Munk hat dann später bei Patienten mit nephrotischem Syndrom zuerst die Plasmalipidabnormalitäten beschrieben und den Begriff der "Lipoid-Nephrose" geprägt, einen Begriff, der bis zur flächendeckenden Einführung der Elektronenmikroskopie praktisch synonym für die Minimal-Changes-Glomerulopathie gebraucht wurde (Munk 1913).

Die ersten konkreteren Hinweise, daß Lipidabnormalitäten mit glomerulären Erkrankungen beim Menschen vergesellschaftet sein könnten, stammen von Gjone in einem Bericht über den seltenen Mangel der Lecithin-Cholesterin-Acyltransferase (LCAT) (Gjone, Blomhoff et al. 1974), einer Erkrankung, bei der es zu Abnormalitäten aller Lipoproteine und vermehrtem Auftreten von unverestertem Cholesterin und Phosphatidylcholin kommt. Klinisch imponieren Niereninsuffizienz, vorzeitige Atherosklerose, Hornhauttrübungen und hämolytische Anämie (Fauci 1998).

Im Tierexperiment an Meerschweinchen konnten French et al. 1967 zeigen, daß eine Diät mit 1% Cholesterin schwere Schädigungen mit Ablagerung von Cholesterin - Kristallen in glomerulären Kapillaren und intraglomerulärer Proliferation von Monozyten verursacht (French, Yamanaka et al. 1967).

Im Jahr 1982 haben Moorhead und Kollegen dann das Interesse auf die Lipide als mögliche Ursache eines glomerulären und tubulointerstitiellen Schadens gerichtet (Moorhead, Chan et al. 1982) und postuliert, daß glomerulär filtrierte Lipoproteine vermehrte Matrixproduktion stimulieren können.

Letztendlich blieben die zitierten Arbeiten aber deskriptiv ohne mögliche Pathomechanismen näher zu beleuchten. In der Folgezeit wurden umfangreiche klinische und experimentelle Untersuchungen angestellt, die versuchten, die pathophysiologische Bedeutung der bei Nierenerkrankungen häufig zu beobachtenden Hyperlipidämie zu klären. Insbesondere in Kombination mit anderen glomerulären Schäden wie Glomerulonephritiden, Bluthochdruck oder Diabetes mellitus konnte eine Verschlimmerung der renalen Schädigung im Tierexperiment gezeigt werden (Keane, Kasiske et al. 1988; Gröne, Walli et al. 1993; Gröne, Walli et al. 1994). Die Pathomechanismen, durch welche die glomerulären und tubulointerstitiellen Läsionen vermittelt werden waren und sind jedoch immer noch nicht

aufgeklärt. Insbesondere blieb die Frage offen, ob es sich bei der Hyperlipidämie um ein Epiphänomen oder eine für die Schädigung ursächliche Veränderung handelt.

1.2 Oxidative Schädigung bei Nierenerkrankungen mit Hyperlipidämie

Hypercholesterinämie ist als Risikofaktor für die Entstehung einer Arteriosklerose bekannt. In atherosklerotischen Plaques sind Schaumzellen regelmäßig und in großer Zahl anzutreffen. Inzwischen konnte aufgeklärt werden, daß die Internalisierung von Cholesterol-Estern aus Plasmalipoproteinen in Makrophagen über einen Scavenger Rezeptor vermittelt wird, von dem es drei Subtypen gibt: einen, der bevorzugt acetyliertes LDL, einen, der oxidiertes LDL und einen, der beide bindet (Brown und Goldstein 1990). Oxidiertes LDL wird rasch von Makrophagen aufgenommen und führt zur Bildung von Schaumzellen. HOCl-modifizierte LDL-Partikel und HOCl-modifizierte Proteine konnten in atherosklerotischen Läsionen nachgewiesen werden (Hazell, Arnold et al. 1996). Diese Beobachtungen führten zu der These, daß möglicherweise reaktive Sauerstoffspezies (ROS) bei der Entstehung der Atherosklerose eine Rolle spielen.

Eine Reihe von experimentellen Daten geben Hinweise, daß ähnliche Mechanismen auch bei den Veränderungen in der Niere von Bedeutung sein können.

In verschiedenen experimentellen Arbeiten konnte eine pathophysiologische Bedeutung für reaktive Sauerstoffspezies bei der Entstehung unterschiedlicher Nierenerkrankungen gezeigt werden. Dabei konnte gesteigertes Auftreten von ROS bei primär immunologisch vermittelter Schädigung wie der passiven Heymann Nephritis (Neale, Ullrich et al. 1993; Neale, Ojha et al. 1994; Gwinner, Plasger et al. 1999), einem Tiermodell für eine membranöse Glomerulonephritis und der Anti-Thy1-Nephritis, einem Modell einer mesangioproliferativen Glomerulonephritis (Gaertner S 1997; Scheuer, Gwinner et al. 2000) demonstriert werden.

Auch bei der Entstehung nichtimmunologisch vermittelter Läsionen wie der Puromycin-Aminonukleosid (PAN) - Nephrose (Gwinner, Landmesser et al. 1997; Drukker und Eddy 1998) und der Adriamycin - Nephrose (Montilla, Tunez et al. 2000; Agapito, Antolin et al. 2001) spielen ROS wahrscheinlich eine wichtige Rolle.

Wheeler konnte 1994 zeigen, daß mesangiale Zellen in der Lage sind, LDL Partikel in vitro oxidativ zu modifizieren (Wheeler, Chana et al. 1994). LDL kann von glomerulären Epithelzellen (Gröne, Walli et al. 1990) und Mesangiumzellen aufgenommen werden (Gröne, Abboud et al. 1992; Gupta, Rifici et al. 1992) und zur Produktion von für Makrophagen chemotaktischen Faktoren führen (Van Goor, Ding et al. 1994). In hypercholesterinämischen Tieren sowie solchen mit experimenteller fokal segmentaler Glomerulosklerose konnten in den Glomerula oxidativ modifizierte LDL durch Immunhistochemie nachgewiesen werden (Diamond und Karnovsky 1988; Magil, Frohlich et al. 1993).

Während diese Arbeiten in der Regel die Veränderungen in Glomerula sehr detailliert beschrieben haben, fehlten meist Daten über das Tubulointerstitium oder sie beinhalteten nur den Nachweis von Lipidperoxiden in Homogenaten aus ganzen Nieren als indirekten Hinweis für die Beteiligung oxidativer Mechanismen (Prasad und Kalra 1989; Neale, Ojha et al. 1994; Lee, Jeong et al. 1997; Ishiyama, Atarashi et al. 1999). Untersuchungen über die bei der Entstehung oxidativ modifizierte Proteine und Lipide möglicherweise beteiligten Enzymssysteme oder der direkte Nachweis von reaktiven Sauerstoffspezies fehlten.

1.3 Reaktive Sauerstoffspezies und ihre Effekte in biologischen Systemen

ROS sind Produkte der teilweisen Reduktion von Sauerstoff und können durch enzymatische und nicht-enzymatische Prozesse innerhalb von Zellen, an der Zellmembran und im extrazellulären Raum entstehen (siehe Abbildung 1). Hypochlorsäure (HOCl) und Hydroxylradikal ($\cdot\text{OH}$) sind dabei die am stärksten wirksamen ROS (Malle, Hazell et al. 1995), wobei HOCl in biologischen Systemen 1000 mal toxischer ist als Superoxidationen oder H_2O_2 (Yamada und Grisham 1991). In der Folge reagieren ROS mit einer Vielzahl biologischer Zielmoleküle, z.B. Lipiden und Proteinen und bilden so Derivate, die wiederum selbst starke oxidative Aktivität zeigen (Winterbourn 1985). So führt die Oxidation von Lipiden zur Bildung von Lipidperoxiden, die wiederum selbst den Oxidationsprozeß unterhalten können (Cheeseman K.H. 1993).

Lokal vermehrtes Auftreten von ROS kann zu direktem Schaden durch Modifikation zellulärer Bestandteile wie Membranlipide und Proteine führen.

Oxidative Modifikation von Proteinen kann Enzyme inaktivieren und den Metabolismus dieser Proteine stören (Bray, Cockle et al. 1974; Fligiel, Lee et al. 1984). Außerdem kann es zur Oxidation von Purinen und Pyrimidinen sowie den angeschlossenen Ribosen kommen, was Quervernetzung oder Fragmentation von Nukleinsäuren zur Folge haben kann (Imlay, Chin et al. 1988; Janssen, Van Houten et al. 1993).

Neben diesen direkt schädigenden Effekten durch oxidative Modifikationen können ROS auch als intrazelluläre Signale auf redox-sensitive Kinasen Einfluß nehmen und so Veränderungen in der Regulation von Cytokinen und Adhäsionsmolekülen bewirken (Lander 1997; Suzuki, Forman et al. 1997; Gwinner 2000). So erfolgt z.B. die Regulation der Transkriptionsfaktoren NF κ B und AP-1 über den intrazellulären Redox-Status (Sen und Packer 1996).

Die Menge an ROS in biologischen Systemen ergibt sich aus einer fein austarierten Balance aus oxidativen und antioxidativen Mechanismen (Ichikawa, Kiyama et al. 1994).

ROS entstehen zum einen nicht-enzymatisch durch die direkte Einwirkung von Sauerstoff, zum anderen durch oxidative Enzyme. Hier ist zunächst die NADPH-Oxidase zu nennen, ein Enzymkomplex aus mehreren membrangebundenen und cytoplasmatischen Untereinheiten, der sich unter anderem in Granula von Granulozyten findet und maßgeblich für den „respiratory burst“, die massive Bildung von ROS bei der unspezifischen zellulären Abwehrreaktion durch stimulierte Granulozyten verantwortlich ist. Man findet ähnliche Enzyme jedoch unter anderem auch in Fibroblasten, Endothelzellen und renalen Tubulusepithelzellen (Chanock SJ 1994) (Geiszt, Kopp et al. 2000).

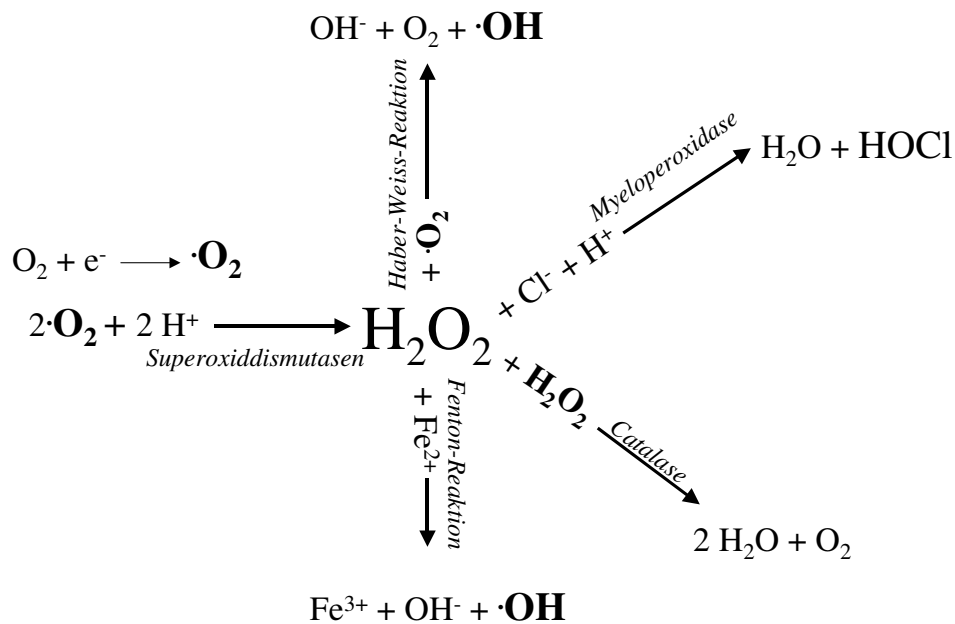


Abbildung 1:
 Schema der wichtigsten Reaktionswege von ROS

Daneben existieren an Zellmembranen, Mikrosomen und in Mitochondrien NADH-Oxidasen, die Superoxidanionen freisetzen können. Ein weiteres Enzym, welches in Peroxisomen und im Zytoplasma vorkommt, ist die Xanthinoxidase, die die Konversion von Hypoxanthin zu Xanthin und weiter zu Harnsäure katalysiert, wobei ebenfalls Superoxidanionen entstehen (Gwinner, Deters-Evers et al. 1998). Die nicht-enzymatische Bildung von Hydroxylradikal ($\cdot\text{OH}$) ist abhängig von der Menge freier Metallionen (Fenton-Reaktion), die über eine Reihe metallbindender Proteine wie Ferritin, Transferrin und Coeruloplasmin geregelt wird.

Zu den zellulären Abwehrmechanismen gehören antioxidative Enzyme, die die Menge der vorhandenen ROS verringern können. Superoxiddismutasen findet man als überwiegend intrazelluläre Enzyme. Sie existieren in zwei Isoformen: einmal als manganhaltiges Enzym in Mitochondrien (MnSOD) und als kupfer- und zinkhaltiges Enzym im Zytoplasma der meisten Säugetierzellen. Beide Isoformen katalysieren die Dismutation von zwei Superoxidanionen ($\cdot\text{O}_2^-$) zu Wasserstoffperoxid (H_2O_2) (Yoshioka und Ichikawa 1994). Wasserstoffperoxid kann dann von Catalase und Glutathionperoxidase weiter abgebaut werden. Zudem wirken einige Vitamine, z.B. A, E und C unter anderem als nicht-enzymatische Radikalfänger.

Die Verteilung der oxidativen und antioxidativen Systeme variiert stark zwischen den einzelnen Organen und auch innerhalb komplexer Organe wie der Niere sind die

Konzentrationen innerhalb der einzelnen Strukturen zum Teil stark unterschiedlich (Muse, Oberley et al. 1994; Gwinner, Deters-Evers et al. 1998).

1.5 Ziele der Arbeit

Es sollte aufgrund der aus der Literatur bekannten und in Abschnitt 1.1 beschriebenen indirekten Hinweise untersucht werden, ob reaktive Sauerstoffspezies bei der Entstehung der renalen Veränderungen bei chronischer Hyperlipidämie eine Rolle spielen. Dabei wurde der Versuch unternommen, ROS direkt im Gewebe nachzuweisen und die Enzymsysteme zu identifizieren, die für die Entstehung verantwortlich sind.

Hierzu wurde das etablierte Modell einer langfristigen, über 150 Tage dauernden diätetisch induzierten Hyperlipidämie verwendet, bei der die renale Schädigung durch vorherige einseitige Nephrektomie akzeleriert wurde (Gröne, Walli et al. 1989). Zudem sollte eine Verbindung zu den funktionellen und histologischen Veränderungen hergestellt werden.

Aufgrund der Ergebnisse des langfristigen Experiments sollte weiterhin untersucht werden, ob Verschiebungen im oxidativ / antioxidativen Gleichgewicht bereits in der Frühphase nach Einsetzen der Hyperlipidämie auftreten und somit möglicherweise als früher pathogenetischer Mechanismus in Frage kommen.

Dabei wurde besonderes Augenmerk auf das Tubulointerstitium gelegt. So sollte zwischen Tubuli und interstitiellen Zellen wie infiltrierenden Entzündungszellen als möglicher Quelle für ROS unterschieden werden.

Zur Klärung der Rolle der Xanthinoxidase als möglicher Ursache für gesteigerte ROS-Generation wurde diese in einem weiteren Experiment in ihrer Aktivität durch Wolframbgabe über das Trinkwasser gehemmt.

Als zusätzliches Modell einer schweren Hyperlipidämie wurde ein nephrotisches Syndrom im Modell der Adriamycin-Nephrose bei der Ratte untersucht. Auch hier sollte die Frage beantwortet werden, ob ROS bei der Entstehung der renalen Schädigung eine Rolle spielen und ob ähnliche Veränderungen wie bei der diätetisch induzierten Hyperlipidämie gefunden werden können.

2. Methoden

2.1 Experimenteller Aufbau

Es wurde ein etabliertes Modell einer diätetischen induzierten Hyperlipidämie gewählt (Gröne, Walli et al. 1989). Hierzu wurden die Tiere den einzelnen Gruppen nach dem Zufallsprinzip zugeordnet und die behandelten Gruppen ausschließlich mit einem Futter mit hohem Cholesterin- und Triglyceridanteil (Fettfutter, Fa. Altromin, Lage) gefüttert.

Kontrolltiere erhielten das übliche pelletierte Standardfutter für Ratten. Darüber hinaus wurde dem Fettfutter 0,35 % Cholsäure (Fa. Sigma) zugesetzt, um die enterale Resorption zu steigern.

Die Zusammensetzung der verschiedenen Diäten geht aus Tabelle 1 hervor.

	Normalfutter [g/100g Futter]	Fettfutter [g/100g Futter]
Protein	18	19,4
Fett	3,8	39,4
Cholesterin	<0,05	5
Kohlenhydrate	36	23,8

Tabelle 1:

Zusammensetzung des Futters

2.1.1 Versuche zur chronischen Hyperlipidämie

Die Untersuchungen zu chronischer Hyperlipidämie wurden an einseitig nephrektomierten Ratten durchgeführt, um die renale Schädigung zu beschleunigen. Junge männliche Wistar-Ratten (Körpergewicht ca. 160 g, Charles River, Sulzfeld) wurden dazu in kurzer Äthernarkose linksseitig nephrektomiert. Tiere in der behandelten Gruppe wurden anschließend über einen Zeitraum von 150 Tagen mit dem oben beschriebenen Fettfutter gefüttert, Kontrolltiere erhielten das normale Futter für Ratten.

2.1.2 Versuche zur kurzzeitigen Hyperlipidämie

In einem kurzzeitigen Experiment, sollte untersucht werden, ob Hyperlipidämie auch schon in der Frühphase funktionelle und morphologische Veränderungen verursacht und oxidative Mechanismen beteiligt sind. In diesem Versuch wurden ebenfalls junge Wistar-Ratten (Körpergewicht ca. 160 g, Charles River, Sulzfeld), mit den oben beschriebenen Diäten behandelt, jedoch wurde auf eine Nephrektomie verzichtet, um Interaktionen mit der kompensatorischen Hypertrophie der verbliebenen Niere zu vermeiden, da zu einem

ähnlichen Untersuchungszeitpunkt bereits eine gesteigerte Menge an ROS bei reduzierter Nephronmasse demonstriert worden war (Yokozawa T 1997; Vaziri ND, Oveisi F et al. 1998). Nach 21 und 35 Tagen Behandlung mit dem o.g. Futter wurden die Tiere getötet und tubulointerstitielles Gewebe sowie proximale Tubuli in gleicher Weise, wie bei den Versuchen im chronischen Modell weiterverarbeitet. Zusätzlich wurden proximale Tubuli isoliert, um so den Effekt der Blutgefäße und infiltrierenden Zellen diskriminieren zu können. In einem weiteren Experiment wurde Tieren unter Fettdiät und Normaldiät Wolfram (Fa. Sigma) in einer Konzentration von 700 mg/l über das Trinkwasser zugeführt. Wolfram wird während der Biosynthese anstelle von Molybdän in das Enzym eingebaut, wodurch die Xanthinoxidaseaktivität vollständig gehemmt wird (Johnson, Waud et al. 1974). Die Wolframingabe wurde drei Wochen vor Beginn der Fütterung mit den verschiedenen Diäten begonnen und bis zur Organentnahme beibehalten.

2.1.3 Untersuchungen im nephrotischen Syndrom

Als Modell für eine Hyperlipidämie im nephrotischen Syndrom diente die Adriamycin-Nephropathie bei der Ratte, bei der eine einmalige intravenöse Gabe von Adriamycin in einer Dosierung von 7mg/kg Körpergewicht zur Ausbildung einer schweren Proteinurie mit Hyperlipidämie führt. Die Tiere wurden 14 und 28 Tage nach der Injektion getötet und die tubulointerstitiellen Gewebeproben sowie die proximalen Tubuli in gleicher Weise wie bei den anderen Experimenten untersucht.

Die Versuche zur kurzzeitigen diätetisch induzierten Hyperlipidämie (vergl. Abschnitt 2.1.2) und zum nephrotischen Syndrom wurden zeitgleich durchgeführt. Unbehandelte, gleichaltrige, mit Normalfutter ernährte Tiere dienten für beide Versuche als gemeinsame Kontrollgruppe

Zeitpunkte	kurzzeitiges Experiment nichtnephrektomierte Ratten				chronisches Experiment uninephrektomierte Ratten			
	21 Tage	<i>n</i>	35 Tage	<i>n</i>	70 Tage	<i>n</i>	150 Tage	<i>n</i>
Kontrolle (Normalfutter)	X	8	X	14	X	10	X	7
Fettfutter	X	8	X	13	X	10	X	7
Normalfutter + Tungsten			X	5				
Fettfutter + Tungsten			X	12				
Adriamycin (Tage nach Inj.)	14 Tage	6	28 Tage	8				

Table 2:
Übersicht über den experimentellen Aufbau

2.2 Tierhaltung und Handhabung

2.2.1 Allgemein

Die Versuchstiere wurden während der gesamten Versuchsdauer in den Versuchstiereinrichtungen der Philipps-Universität Marburg (Conradistraße, Marburg/Lahn) oder der Medizinischen Hochschule Hannover (Carl-Neuberg-Straße, Hannover) entsprechend den dort geltenden Vorschriften gehalten und hatten jederzeit freien Zugang zu Trinkwasser und Futter. Die Versuche wurden nach Tierschutzgesetz genehmigt.

2.2.2 Blutdruckmessung

Die Messung des systolischen Blutdrucks erfolgte durch Schwanzvenenplethysmographie in leichter Äthernarkose (Helmchen, RM et al. 1984; Gröne 1986). Eine aufblasbare Manschette am Schwanz des Tieres wurde über den systolischen Druck aufgepumpt. Anschließend wurde der Druck wieder abgelassen. Bei Erreichen des systolischen Blutdrucks kam es durch das wiedereinströmende Blut zu einer Volumenzunahme des Schwanzes, die registriert wurde, so daß in diesem Moment der systolische Blutdruck abgelesen werden konnte.

2.2.3 Urinsammlung

Am Tag vor der Organentnahme wurde in Stoffwechselkäfigen Urin für die Bestimmung der Proteinausscheidung über 24 h gesammelt. Während der Sammelperiode hatten die Tiere freien Zugang zu Trinkwasser, bekamen aber kein Futter, um eine Verunreinigung des Urins durch herabfallende Futterreste zu vermeiden. Der Urin wurde unter einer Schicht flüssigen Paraffins gesammelt, um Verdunstungsverluste zu minimieren.

2.3 Organentnahme und Präparation der Gewebe

2.3.1 Verwendete Puffer

2.3.1.1 Krebs-Henseleit-Saline (KHS) (Vinay, Gougoux et al. 1981):

KHS-Puffer (Endkonzentration: NaHCO_3 29 mM, NaHPO_4 1,2 mM, KCl 5 mM, CaCl_2 2 mM, NaCl 109 mM, pH 7,4) wurde für die in-situ-Perfusion der frischen Nieren, die Isolierung der Glomerula, proximalen Tubuli und des tubulointerstitiellen Gewebes verwendet.

Der Puffer wurde aus zwei 25fachen Stocklösungen (Lsg. A: 725mM NaHCO_3 und 30 mM NaHPO_4) sowie (Lsg. B: 125 mM KCl , 50 mM CaCl_2 , 2725 mM NaCl) angesetzt, die erst kurz vor Gebrauch gemischt und unter pH-metrischer Kontrolle mit 5 M HCl auf einen pH von 7,4 eingestellt wurden

2.3.1.2 Krebs-Ringer (Gwinner, Deters-Evers et al. 1998):

Krebs-Ringer (Endkonzentration: NaCl 136 mM, KCl 4,7 mM, KH_2PO_4 1,2 mM, MgSO_4 1,2 mM, HEPES 10 mM, CaCl_2 1,8 mM, Glukose 5 mM) wurde für die Lagerung und Suspendierung der Proben zur Bestimmung der Aktivitäten der oxidativen Enzyme benutzt. Der Puffer wurde täglich frisch aus Stocklösungen angesetzt.

Lsg. A (10x): NaCl 1,36 M, KCl 47 mM, KH_2PO_4 12 mM, MgSO_4 12 mM, HEPES 100 mM

Lsg. B (100x): CaCl_2 180 mM

Lsg. C (100x): Glukose 500 mM

Alle Stocklösungen wurden tiefgefroren in passenden Aliquots gelagert. Der Puffer wurde mit 1 M NaOH auf pH 7,4 eingestellt.

2.3.1.3 Kalium-Phosphat-Puffer (Gwinner, Deters-Evers et al. 1998):

Zur Lyse der Proben für die Bestimmung der Aktivitäten der antioxidativen Enzyme wurde ein 50 mM Kalium-Phosphat -Puffer mit 0,1mM EDTA und 1% Triton X-100, pH 7,8 verwendet. Der Puffer wurde aus zwei 1 M K_2HPO_4 bzw. KH_2PO_4 Lösungen mit je 2 mM EDTA durch mischen auf pH 7,8 eingestellt, verdünnt und mit Triton X-100 versetzt.

2.3.2 Organentnahme

Zur Organentnahme wurden die Tiere durch Genickbruch getötet und das Abdomen durch einen großzügigen Mittellinienschnitt eröffnet. Durch Herzpunktion wurde eine Blutprobe gewonnen. Die Aorta wurde kanüliert, die untere Hohlvene eröffnet und die Nieren nach Ligatur der proximalen Aorta mit ca. 10 ml eiskaltem KHS-Puffer blutleer gespült.

Anschließend wurden die Nieren entnommen, dekapuliert und eine ca. 1 mm dicke Scheibe aus der Mitte des Organs für die histologische Aufarbeitung entnommen.

2.3.3 Präparation der Glomerula und des tubulointerstitiellen Gewebes

Von dem nach Entnahme des Gewebes für die histologischen Untersuchungen verbliebenen Rest der Nieren wurden die makroskopisch sichtbaren medullären Anteile mit einer kleinen Schere entfernt. Der verbliebene Kortex wurde mit einer Rasierklinge fein zerkleinert und anschließend unter reichlichem Spülen mit ca. 2 l eisgekühltem KHS-Puffer zur weiteren Disaggregation durch ein Sieb mit 300 µm Maschenweite gerieben. Auf dem darunter befindlichen Sieb mit 150 µm Maschenweite wurde kortikales tubulointerstitielles Gewebe aufgefangen. Die Glomerula wurden durch weiteres Spülen auf das unterste Sieb mit 75 µm Maschenweite transferiert und dort aufgefangen. Bei den zum Zeitpunkt der Organentnahme jüngeren und nicht nephrektomierten Tieren für die Kurzzeitexperimente wurde statt des Siebs mit 75 µm Maschenweite eines mit 53 µm Maschenweite gewählt, um die Ausbeute zu erhöhen.

Die Reinheit der glomerulären Präparationen wurde bei jeder Präparation lichtmikroskopisch kontrolliert und betrug stets deutlich über 90 %. In der tubulointerstitiellen Fraktion fanden sich nach lichtmikroskopischer Kontrolle nahezu keine Glomerula.

Tubulointerstitielles Gewebe und Glomerula wurden nach der Präparation in KHS-Puffer gewaschen, für die einzelnen Bestimmungen aliquotiert und wie unten beschrieben weiterbehandelt.

2.3.4 Isolierung proximaler Tubuli

Proximale Tubuli wurden durch Dichtegradientenzentrifugation mit Percoll[®] (Fa. Pharmacia, Upsalla Schweden) gewonnen (Vinay, Gougoux et al. 1981; Gwinner, Deters-Evers et al. 1998). Nach Entnahme einer Niere für die Isolation von Glomerula und Tubulointerstitium mit der oben beschriebenen Siebmethode, wurde die verbliebene Niere in situ mit 10 ml 0,1% Collagenase (Fa. Sigma) in KHS-Puffer perfundiert und anschließend manuell die sichtbaren medullären Anteile mit einer Schere entfernt. Das Gewebe wurde mit einer Rasierklinge grob zerkleinert, anschließend für 30 min. bei 37 °C im Schüttelwasserbad in 30 ml 0,1% Collagenase inkubiert und währenddessen mit Carbogen (95 % O₂, 5 % CO₂, Fa. Linde, Hannover) begast.

Die entstehende Suspension kortikaler Nierenstrukturen wurde anschließend über ein Sieb (Maschenweite 150 µm) gegeben, um größere Gewebeteile zu entfernen, durch Zentrifugation sedimentiert, zweimal mit kaltem KHS-Puffer resuspendiert und erneut zentrifugiert um die Collagenase zu entfernen. Das Pellet wurde in gepuffertem 45 % Percoll (22,5ml Percoll + 27,5ml 1,82fach KHS-Puffer pH 7,4) aufgenommen, gut durchmischt und die Suspension auf zwei Zentrifugenröhrchen verteilt. Anschließend erfolgte die Zentrifugation bei 10000g für 30 Minuten bei 4 °C.

Das kortikale Material wurde hierdurch entlang des Dichtegradienten im Percoll in drei Banden aufgetrennt. Die oberste Bande bestand im Wesentlichen aus Glomerula. Es folgte ein relativ breiter und unscharfer Bereich, in dem überwiegend distale Tubuli und kleine Fragmente anderer Tubulusabschnitte zu finden waren. Im unteren Drittel des Röhrchens fand sich eine scharf begrenzte Bande mit proximalen Tubuli in über 90% Reinheit. Die Charakterisierung der einzelnen Banden erfolgte nativ lichtmikroskopisch sowie nach Fixierung in Methacarn, Einbettung in Paraffin und PAS-Färbung.

2.4 Histomorphologische Untersuchungen

Die Gewebeproben zur histologischen Untersuchung wurden je zur Hälfte in 4 %igem, phosphatgepuffertem Formalin (pH 7,35) und Methacarn (60% Methanol, 30% Chloroform, 10% Eisessig) fixiert. Methacarn - fixiertes Material wurde spätestens nach 12 Stunden bis zur Einbettung in Paraffin in 100 % Ethanol überführt, um eine Überfixierung mit Schrumpfungartefakten zu vermeiden.

3 µm dicke Paraffin - Schnitte wurden zur histologischen Beurteilung der glomerulären und interstitiellen Schädigung mit Perjodsäure - Schiff's Reagenz (PAS) nach den üblichen Routineverfahren gefärbt (Romeis 1992).

Zudem wurden immunhistochemische Untersuchungen zur Infiltration mit Monozyten / Makrophagen und zur zellulären Proliferation durchgeführt.

2.4.1 Glomeruläre Schädigung

Die glomeruläre Schädigung wurde anhand von Sklerosezeichen, der Verbreiterung der mesangialen Matrix und der mesangialen Zelldichte durch ein semiquantitatives Scoresystem beurteilt (Stojanovic, Gröne et al. 1996).

glomeruläre Sklerose:

Grad 0: glomeruläre Schnittflächen ohne erkennbare Läsion

Grad 1: bis zu 25 % obliteriertes kapilläres Schlingenkonvolut

Grad 2: 25-50 % obliteriertes kapilläres Schlingenkonvolut

Grad 3: 50-75 % obliteriertes kapilläres Schlingenkonvolut

Grad 4: mehr als 75 % obliteriertes kapilläres Schlingenkonvolut

mesangiale Matrixvermehrung:

Grad 0: keine Veränderung,

Grad 1: geringgradige Verbreiterung,

Grad 2: mäßige Verbreiterung,

Grad 3: ausgeprägte Verbreiterung.

mesangiale Zelldichte:

Grad 0 (weniger als 3 Zellen / mesangiales Feld, Normalbefund),

Grad 1 (3-4 Zellen / mesangiales Feld),

Grad 2 (5-7 Zellen / mesangiales Feld),

Grad 3 (mehr als 7 Zellen / mesangiales Feld)

Pro Niere wurden jeweils 50 Glomerula beurteilt, indem der Kortex mäanderförmig ausgehend von einem zufällig gewählten Areal abgesucht wurde.

Der Index für glomeruläre Sklerose, mesangiale Verbreiterung und mesangiale Zelldichte wurde als Summe der obengenannten Grade errechnet, nachdem Grad 1 mit 1, Grad 2 mit 2, Grad 3 mit 3 und Grad 4 mit 4 multipliziert worden waren (Scheuer, Gwinner et al. 2000).

2.4.2 Interstitielle Schädigung und Zellzahl

Das Ausmaß der interstitiellen Schädigung wurde mit einem computergestützten Bildanalyse-System (Cue 3 Colour image analyzer, Galai version 4.6p; Olympus Haemek, Israel) ermittelt.

Dazu wurden bei 200facher Vergrößerung Flächen interstitieller Vernarbung mit atrophischen Tubuli und interstitieller Matrixvermehrung, sowie Areale mit dichtem leukozytärem entzündlichem Infiltrat ausgemessen und als Prozent der Gesamtfläche angegeben. Es wurden pro Niere 10 zufällig gewählte kortikale Gesichtsfelder ausgewertet und der Mittelwert aus den Flächenbestimmungen angegeben.

Die interstitielle Zelldichte wurde ermittelt, indem in 20 zufällig gewählten kortikalen Gesichtsfeldern pro Nierenscheibe im PAS-gefärbten Schnitt bei 400facher Vergrößerung alle interstitiellen Fibroblasten und infiltrierenden Leukozyten gezählt und der Mittelwert pro Gesichtsfeld berechnet und angegeben wurde.

2.5 Immunhistochemische Untersuchungen

2.5.1 Infiltration mit Monozyten / Makrophagen

Die Detektion der infiltrierenden Monozyten / Makrophagen erfolgte immunhistochemisch mit der APAAP-Methode, bei der der Enzym-Antikörperkomplex über einen Brückenantikörper an den Primärantikörper gekoppelt wird. Als Primärantikörper diente der monoklonale murine Antikörper ED1 (MCA 341, Serotec, Oxford), der an 3 µm dicken Methacarn-fixierten Schnitten eingesetzt wurde.

Die Paraffinschnitte wurden auf mit 3-Aminopropyltriethoxy-silane (APES) beschichtete Objektträger aufgezogen und in der abfallenden Xylol /Alkoholreihe entparaffiniert. Nach zweistündiger Inkubation mit 20 µl 1:50 verdünntem Maus-Anti-Ratte-ED1 Antikörper bei Raumtemperatur in der feuchten Kammer wurden die Schnitte dreimal mit PBS gewaschen und anschließend jeweils 20 µl des 1:40 verdünnten Brückenantikörpers aufgetragen (Z 259 Rabbit Anti-Mouse Immunglobulins, DAKO, Glostrup, DK). Nach erneutem zweimaligen Waschen mit PBS wurde für eine Stunde mit monoklonalem Maus-Alkalische-Phosphatase-Anti-Alkalische-Phosphatase-Komplex DG 51 (1:40 in PBS) (DAKO Code D 651) inkubiert. Anschließend wurden die Schnitte mit Aqua bidest. gewaschen und für 30 min. bei Raumtemperatur mit Substrat und 5 mM Levamisol inkubiert.

Substrat:

- a) 150 mg Natriumnitrit in 3750 µl H₂O, dazu 155 µl Neufuchsin 5%
 - b) 20 mg Naphthol AS-biphosphat ad 375 µl N,N-dimethylformamid
- Lösung a) und b) mit Tris-Puffer (pH 8,7) auf 75 ml auffüllen

Nach erneuter Waschung mit Aqua bidest. erfolgte eine leichte Gegenfärbung mit Hämalaun. Anschließend wurden die Schnitte mit Immunomount (Shandon, Pittsburg) eingedeckt und mikroskopisch ausgewertet.

Auswertung:

Interstitielle Monozyten / Makrophagen wurden in 20 kortikalen Gesichtsfeldern bei 400facher Vergrößerung ausgezählt.

Zur Beurteilung der glomerulären Infiltration wurden je 50 glomeruläre Schnittflächen ausgezählt und der Mittelwert der markierten Zellen pro glomerulärer Querschnitt angegeben.

2.5.2 Beurteilung der Zellproliferation

In einigen Experimenten wurde den Tieren zur Detektion von Zellproliferation exakt 24 h vor der Organentnahme 5-Bromo-2'-deoxyuridin in einer Dosierung von 5 mg/kg Körpergewicht intraperitoneal injiziert. Diese Substanz wird als Thymidinanalogon in die DNA proliferierender Zellen eingebaut und kann mit einem anti-BrdU Antikörper (Fa. DAKO, DK) detektiert werden.

Formalin-fixierte Paraffinschnitte wurden auf APES-beschichteten Objektträgern aufgezogen und in üblicher Weise bis zum 96 % Alkoholbad entparaffiniert. Nach Blockierung der endogenen Peroxidase mit H₂O₂ und Pepsinandau zum Antigenaufschluß wurde zusätzlich ein DNA-Aufschluß mit Exonuclease durchgeführt und gleichzeitig mit dem Anti-BrdU-Antikörper inkubiert. Die Detektion erfolgte nach Inkubation über einem Anti-Maus-IgG-Brückenantikörper und anschließender Inkubation mit dem Peroxidase-Antiperoxidasekomplex, der schließlich nach Bindung an den Brückenantikörper die Farbreaktion katalysiert.

Verwendete Lösungen:

Puffer A: Eco-Ri Puffer

7mM MgCl₂, 50 mM NaCl, 7mM β-Mercaptoethanol,
1 % BSA in 50 mM Tris-Puffer (pH 7,6), Gesamt pH 7,4

Puffer B: Verdünnungspuffer für Exonuclease III

0,05 % BSA, 10 mM β-Mercaptoethanol in 50 mM Tris pH 7,6

Substanzen:

Anti-BrdU:	Monoclonaler Maus Anti-Bromodeoxyuridine, DAKO Glostrup, DK
Exonuclease III:	Fa. Boehringer, Mannheim
Z 259	Kaninchen Anti-Maus Immunglobuline, DAKO
APES:	3-Aminopropyltriethoxysilane, Fa. Sigma
PAP:	Polyclonaler Maus Peroxidase-Antiperoxidase-Komplex, DAKO Code No B650
DAB:	3,3'-Diaminobenzidine tetrahydrochloride dihydrate, Fa. Aldrich/Milwaukee, Wi, USA
Pepsin:	Fa. Sigma

Andauung:

8 mg Pepsin in 200 ml 0,1 N HCl
Spülung mit Aqua dest. und Trocknung

Inkubation: 30 min bei 37 °C

Blockung:

500 µl 30% H₂O₂ in 100 ml Methanol
anschließend mit H₂O spülen,

Inkubation: 20 min bei Raumtemperatur

Simultaninkubation anti-BrdU und Exonuclease III:

425 µl Eco-Ri Puffer (Puffer A)

10 µl Exonuclease III (vorverdünnt auf 0,5 U/µl in Puffer B)

25 µl Anti-BrdU

Inkubation: 45 min. bei 37°C

dreimal mit PBS spülen

Kaninchen Anti-Maus Immunglobulin (Z 259) (1:40 in PBS)

z.B. 20µl

Inkubation 30 min. bei 37°C

zweimal spülen mit PBS

PAP (1:400 in PBS)

zweimal spülen mit PBS

Substrat:

5 mg DAB ad 10 ml PBS, filtrieren

kurz vor Gebrauch 10 µl 30% H₂O₂ dazugeben

Inkubation: 7 min. bei Raumtemperatur

spülen mit Aqua bidest, Gegenfärben mit Hämalaun.

In aufsteigender Alkoholreihe und Xylol entwässern und mit Entelan (Fa. Merck) eindecken.

Auswertung:

In 20 kortikalen Gesichtsfeldern bei 400facher Vergrößerung wurden alle markierten Zellen getrennt nach Tubulusepithelien und interstitiellen Zellen ausgezählt und jeweils der Mittelwert pro Gesichtsfeld angegeben.

2.6 Klinische Chemie

Die Bestimmung der Cholesterin-, Triglycerid- und Serumkreatininwerte erfolgte im Institut für klinische Chemie der Philipps - Universität Marburg mit den dort üblichen Autoanalyzermethoden.

2.7 Proteinbestimmung

Zur Bestimmung des Proteingehaltes in den Gewebehomogenaten und im Urin wurde die Methode von Lowry et al. (Lowry, Rosebrough et al. 1951) eingesetzt.

Stocklösungen:

Lösung „A“: KNa-Tartrat 0,5 g
 Na₂CO₃ 20 g
 ad 1 l Aqua bidest.

Lösung „B“: 100 mg CuSO₄ ad 100 ml Aqua bidest.

Gebrauchslösungen:

Lösung „C“: 9 Teile Lsg. „A“ + 1 Teil Lsg. „B“

Folin Gebrauchslösung: Folin-Ciocalteus-Phenol-Reagenz (Fa. Merck) 1:2 mit Aqua bidest verdünnt

Zunächst wurden die Proben mit dem vierfachen Volumen 10 % Trichloressigsäure aufgenommen und das Eiweiß ausgefällt. Der Niederschlag wurde in 1 N NaOH aufgenommen. Bovines Serum Albumin (Fa. Sigma, 100 mg ad 100 ml) diente als Standard (10-50 µl = 10-50 µg) und wurde wie die Proben behandelt.

Ansatz:

100 µl Probe in 1 N NaOH

1 ml Lösung „C“

nach 10 min. Zugabe von

100 µl Folin Gebrauchslösung

Die Messung der Extinktion bei 578 nm erfolgte nach einer Inkubationszeit von 40 min bei Raumtemperatur. Die Konzentration der Proben wurde über die mitgeführten Standards berechnet.

2.8 Proteinbestimmung in Gegenwart von Triton X-100

Bei Proben, die Triton-X 100 enthielten wurde die modifizierte Lowry-Methode nach Wang eingesetzt (Wang and Smith 1975).

Kupferlösung: 250 mg Cu-EDTA
20 g Na₂CO₃
10 ml 10 N NaOH ad 1 l H₂O

SDS Lösung: 100 g SDS ad 1 l H₂O
Folin-Ciocalteus-Phenol-Reagenz 1:2 mit Aqua bidest. verdünnt

Standards und Proben wurden wie unter Kapitel 2.7 beschrieben gefällt und in 50 µl 1N NaOH aufgenommen.

Ansatz:

500 µl Kupferlösung , durchmischen
15 min bei Raumtemperatur inkubieren lassen
500 µl SDS 10 % (s. o.)
durchmischen und sofort danach Zugabe von
50 µl 1:2 verdünntes Folin-Ciocalteus-Phenol-Reagenz

Nach 30 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur erfolgte die Messung der Extinktion bei 500 nm im Spektralphotometer und Berechnung der Konzentration anhand der mitgeführten Albumin-Standards, die ebenfalls in dem Triton-haltigen Puffer aufgelöst waren (vergl. Abschnitt 2.3.1.3).

2.9 Messung reaktiver Sauerstoffspezies im Gewebe

Die Messung von ROS in frisch isolierten Glomerula, tubulointerstitiellem Gewebe und proximalen Tubuli erfolgte mit Chemilumineszenzmethoden. Dabei dienten zum einen Lucigenin, zum anderen Luminol als Detektorsubstanzen. Lucigenin detektiert mit hoher Sensitivität extra- und intrazelluläres $\cdot\text{O}_2^-$ (Li, Zhu et al. 1998), Luminol wird auch durch andere ROS wie $\cdot\text{OH}$, HOCl und in geringerem Umfang H_2O_2 erregt und detektiert somit auch ROS, die bei der Messung mit Lucigenin nicht erfaßt werden (Kahl R, Weimann A et al. 1987).

Lucigenin wurde als Chemilumineszenz-Substrat für die Detektion von $\cdot\text{O}_2^-$ eingesetzt. Dies basiert auf der Fähigkeit von Lucigenin (Luc^{2+}) zu LucH^+ reduziert zu werden, welches dann mit $\cdot\text{O}_2^-$ zu einer instabilen Dioxetan-Komponente reagiert, die spontan in ihrer Grundelektronenkomposition zurückfällt und dabei Licht emittiert. Die Validität der Messung konnte 1998 von Li und Mitarbeitern bestätigt werden (Gyllenhammar 1987; Li, Zhu et al. 1998).

Die Messung erfolgte mit einem Berthold LB 9505 Mehrkanalszintillationszähler (Fa. Berthold, Wildbad, Deutschland). Dieses Gerät verfügt über sechs unabhängige Meßkammern, die konstant auf 37 °C temperiert sind. Die Meßdaten wurden direkt durch einem angeschlossenen Computer aufgezeichnet und gespeichert. Die hierzu benötigte Software wurde freundlicherweise von Dr. Ralf P. Brandes (Univ. Frankfurt / Main) zur Verfügung gestellt.

Unmittelbar nach der Präparation wurden die Gewebefraktionen in „Dulbecco's Minimal Essential Medium for Chemiluminescence“ (Fa. Boehringer, Mannheim) (MEM) aufgenommen und unverzüglich untersucht. Der gesamte Reagenzienansatz wurde direkt in die Szintillationsröhrchen (Fa. Sarstedt) pipettiert und im Gerät bei 37°C äquilibriert.

Meßansatz:

390 μl MEM

10 μl Lucigenin 13 mM oder Luminol 37,3 mM

(Endkonzentration für Lucigenin 0,26mM, für Luminol 0,75mM)

Nach Äquilibrierung wurde über 3-4 min die Hintergrundaktivität registriert und anschließend durch Zugabe von 100 μl der Probensuspension die Messung gestartet. Es konnte nun eine steile Zunahme der Szintillationen beobachtet werden, die nach einigen Minuten in ein

Plateau übergang. Der Meßwert ergab sich aus dem Mittelwert der Szintillationen über zwei Minuten im Bereich des sich einstellenden Plateaus abzüglich der Hintergrundaktivität. Im Anschluß an die Messung wurde in allen Meßgefäßen der Proteingehalt nach der Lowry-Methode bestimmt und die Ergebnisse als "counts/min x µg Protein" ausgedrückt.

Bei den Untersuchungen zur langfristigen Hyperlipidämie wurde zur Messung ein ähnliches Gerät (Berthold Biolumat LB 9505 C) verwendet. Die Meßwerte für ROS der langfristigen und kurzfristigen Hyperlipidämieversuche sind aufgrund der Tatsache, daß verschiedene Geräte verwendet wurden in ihren Dimensionen unterschiedlich und daher nicht unmittelbar miteinander vergleichbar.

Im kurzfristigen Experiment wurde zusätzlich H_2O_2 mit Meerrettich-Peroxidase (HRP, horseradishperoxidase, Sigma P 8375) nachgewiesen. Die Zugabe von 1 Unit des Enzyms führt in Anwesenheit von H_2O_2 zu einem zur Wasserstoffperoxidkonzentration proportionalen Anstieg des CL-Signals. Die Spezifität der Messung wurde jeweils durch Zugabe von 200 Units Catalase gezeigt, wodurch das Signal komplett gehemmt werden konnte.

2.10 Bestimmung der Aktivität der oxidativen Enzyme

Das Prinzip der Messung beruht auf der Interaktion von Superoxidanionen, die beim Umsatz von Xanthin zu Harnsäure durch Xanthinoxidase oder NADH- und NADPH-Oxidasen mit ihren Substraten freierwerden, mit der Detektorsubstanz Lucigenin. Die dabei entstehenden Szintillationen wurden mit einem 6 Kanal Szintillationszähler (Berthold LB 9505) detektiert und gezählt. Ergebnisse wurden als „counts per minute“ (cpm) ausgedrückt und auf die eingesetzte Proteinmenge bezogen. Die Methode korreliert in einem weiten Bereich linear mit der Konzentration von Superoxidanionen, wie in früheren Arbeiten gezeigt werden konnte (Brandes 1995; Gwinner, Deters-Evers et al. 1998; Gwinner, Plasger et al. 1999).

Vorbereitung der Proben:

Die Proben wurden unmittelbar nach der Gewinnung in Krebs-Ringer Puffer eingefroren und bei $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ bis zur Weiterverarbeitung gelagert. Nach dem Auftauen wurden die Proben mit einem Teflon-Potter eine Minute lang auf Eiswasser homogenisiert und ein Aliquot zur Proteinbestimmung abgenommen. Die Proben wurden noch einmal einem Gefrier-Auftau-Zyklus unterworfen, da sich in Vorversuchen gezeigt hatte, daß so die höchsten Aktivitäten gemessen wurden. Bis zur eigentlichen Messung wurden die homogenisierten Proben erneut bei $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ eingefroren und erst unmittelbar vor der Messung aufgetaut. Der Proteingehalt der Proben wurde mit der Lowry-Methode bestimmt (vergl. Abschnitt 2.7).

2.10.1 Xanthinoxidase Aktivität

Die Messungen der Aktivität der Xanthinoxidase wurden in Anlehnung an die Methode von Mohazzab (Mohazzab und Wolin 1994) in einem 100 mM Tris-Puffer mit 1 mM EDTA, pH 9,00 durchgeführt.

Ein derartig stark alkalischer pH wurde gewählt, weil die Sensitivität der Messung mit Lucigenin im alkalischen Bereich deutlich höher liegt als bei physiologischem pH.

Das Gesamtvolumen der einzelnen Meßansätze betrug 500 μl . Lucigenin war im Meßansatz in einer Konzentration von 0,26 mM vorhanden. Zu diesem Ansatz wurde Probensuspension entsprechend 50 μg Protein in Krebs-Ringer-Puffer zugegeben, das Gemisch im Thermoblock bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ ca. 10 min. vorgewärmt und schließlich für zwei Minuten im Berthold-Biolumat die Hintergrundaktivität registriert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 10 μl einer 2,5 mM Xanthinlösung in o.g. Tris-Puffer gestartet (Endkonzentration 0,05 mM) und das Signal bis zum sicheren Erreichen eines Plateaus aufgezeichnet. Es wurden stets Doppelbestimmungen durchgeführt. Die Spezifität der Messung konnte durch Zugabe von

Oxypurinol (Endkonzentration 0,2 mM), einem spezifischen Inhibitor der Xanthinoxidase, belegt werden. Dieser Inhibitor hemmte die Xanthin induzierte Chemilumineszenz vollständig.

2.10.2 NADH- und NADPH - Oxidase Aktivitäten

Die Messung wurde in einem 50 mM Phosphatpuffer (pH 7,0) mit 1 mM EGTA und 100 mM Saccharose durchgeführt (Griendling, Minieri et al. 1994). Der Puffer wurde wegen der Verkeimungsgefahr täglich frisch angesetzt. Die Substrate NADH und NADPH wurden als jeweils 1 mM Stammlösungen in 1 % NaHCO₃ angesetzt.

Lucigenin war im Meßansatz in einer Konzentration von 0,26 mM vorhanden. Zu diesem Ansatz wurde Probensuspension entsprechend 5 µg Protein in Krebs Ringer Puffer zugegeben, das Gemisch im Thermoblock bei 37 °C ca. 10 min. vorgewärmt und schließlich für wenige Minuten im Biolumaten die Hintergrundaktivität registriert.

Die Reaktion wurde durch Zugabe von 50 µl der jeweiligen 1 mM Substratlösung gestartet und die Aufzeichnung bis zum Überschreiten eines Maximums fortgesetzt. Das Gesamtvolumen des jeweiligen Einzelansatzes betrug ebenfalls 500 µl und es wurden mindestens Doppelbestimmungen durchgeführt.

Auswertung der Meßkurven zur NADH-, NADPH- und Xanthinoxidaseaktivität:

Im Bereich des Maximums liegende Meßwerte wurden gemittelt und die Hintergrundaktivität abgezogen. Der Differenzbetrag wurde auf den Proteingehalt bezogen und das Ergebnis als „counts/min. x µg Proteingehalt“ angegeben.

2.11 Bestimmung der Aktivitäten der antioxidativen Enzyme

Vorbereitung der Proben:

Die Proben wurden unmittelbar nach der Gewinnung in 50 mM Phosphatpuffer mit 1 % Triton-X-100 aufgenommen und eine Stunde auf Eis lysiert. Anschließend wurden verbliebene feste Bestandteile durch Zentrifugation bei 10000 rpm in einer auf 4°C gekühlten Zentrifuge sedimentiert, der Überstand in Aliquots für die einzelnen Enzymbestimmungen und die Messung des Proteingehaltes verteilt und bei -70 °C gelagert. Alle Bestimmungen der antioxidativen Enzyme wurden mit einem Beckman DU 62 Spektralphotometer durchgeführt. Die Verwendung eines dazugehörigen „kinetics“ - Programmes ermöglichte die regelmäßige Messung in definierten Zeitintervallen nach Start der Reaktion.

2.11.1 Catalase-Aktivität

Die Catalase-Aktivität wurde photometrisch bei einer Wellenlänge von $\lambda=240$ nm anhand des Umsatzes von H_2O_2 bestimmt (Aebi 1982). Die Messung wurde in einem 50 mM K-PO_4 / 0,1 mM EDTA Puffer bei pH 7,0 durchgeführt. Als Substrat diente eine 20 mM H_2O_2 -Lösung, die durch Verdünnen der ca. 30 % Ausgangslösung (Merck 7209 p.a.) mit K-PO_4 Puffer nach photometrischer Ermittlung der tatsächlichen Konzentration ($\epsilon_{240}=0,0425 \times \text{mM}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$) hergestellt wurde.

Die eingesetzte Probenmenge entsprach jeweils ca. 5µg Protein

Der allgemeine Ansatz setzte sich wie folgt zusammen:

250 µl 20 mM H_2O_2 (Endkonzentration 10mM)

250 µl Probe in 50 mM K-PO_4 / 0,1 mM EDTA-Puffer

Die Messung wurde nach Zugabe der Probe und sofortigem Mischen gestartet. Es wurde über einen Zeitraum von 2 min. alle 15 Sekunden gegen Kaliumphosphat - Puffer als Leerwert gemessen. Die Berechnung der Enzymaktivität erfolgte über den Extinktionskoeffizienten für H_2O_2 unter Verwendung der mittleren Extinktionsänderung während der ersten Minute. Die Linearität der Messung im verwendeten Bereich konnte durch eine Catalase Standardreihe gezeigt werden.

2.11.2 Glutathionperoxidase - Aktivität

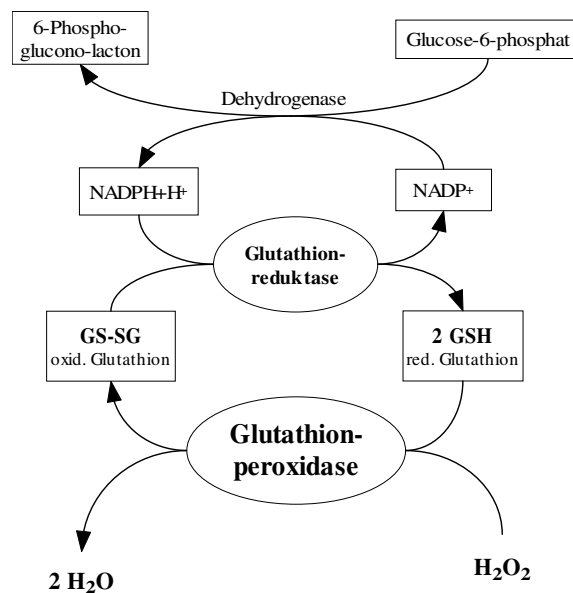


Abbildung 2: Reaktionsschema bei der Bestimmung der Glutathionperoxidase - Aktivität

Zur Bestimmung der Glutathionperoxidase - Aktivität (GPX) wurde die Methode von Beutler (Beutler 1975) mit geringen Modifikationen verwendet. In einer gekoppelten Reaktion dient dabei Tert-butyl-hydroperoxid (TBH) als Substrat für die Glutathionperoxidase, die unter Reduktion des TBH Glutathion oxidiert.

Oxidiertes Glutathion wird in einem zweiten Schritt von Glutathionreduktase unter Verbrauch von NADPH wieder reduziert. Dabei korreliert die umgesetzte Menge von NADPH direkt mit der Aktivität der Glutathionperoxidase. Der Umsatz von NADPH kann bei einer Wellenlänge von 340 nm photometrisch verfolgt werden.

Die Messung wurde in 1 M Tris, 5 mM EDTA Puffer, pH 8,0 durchgeführt.

Verdünnungen der Proben und GPX-Standards (Fa. Sigma) wurden mit einer β -Mercaptoethanol / EDTA-Lösung (0,63 mM / 2,5 mM) vorgenommen (5 μ l 12,54 M β -Mercaptoethanol + 500 μ l 0,5 M EDTA, pH 8 in 100 ml H₂O). NADPH (Fa. Sigma) wurde als 0,2 mM Lösung in BME / EDTA-Lösung angesetzt.

Allgemeiner Reaktionsansatz (Gesamtvolumen 500 μ l): Endkonzentration:

50 μ l 1 M/5 mM TrisCl/EDTA

0,1 M/0,5 mM

50 μ l 20 mM Glutathion

2mM

50 μ l 2 mM NADPH	0,2 mM
5 μ l Glutathionreduktase 0,1 unit/ μ l	0,5 unit/500 μ l
Probe (5-10 μ g Protein)	

Das Volumen des Ansatzes wurde mit Aqua bidest. auf 490 μ l ergänzt und das Gemisch im auf 25 °C temperierten Küvettenwechsler für 5 min. inkubiert. Anschließend wurde die Reaktion durch Zugabe von 10 μ l 3,5 mM TBH gestartet (Endkonzentration: 70 μ M). Nach Kalibrierung gegen Luft erfolgte die Messung alle 15 sec. über einen Zeitraum von vier Minuten.

Ein Ansatz ohne Probe oder Standard diente zur Bestimmung der nichtenzymatischen Oxidation von NADPH und Glutathion durch TBH. Dieser Wert wurde von allen Meßwerten abgezogen. Die Aktivität wurde über den Extinktionskoeffizienten von NADPH ($\epsilon=6,22 \times \text{mM}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$) anhand der Extinktionsänderung während der 1. und 2. Minute errechnet und auf den Proteingehalt bezogen. Zur Demonstration der Linearität und Konstanzhaltung der Meßbedingungen wurde täglich eine Standardreihe mit 1 - 20 mU GPX (Fa. Sigma) mitgeführt.

2.11.3 Superoxiddismutase-Aktivität

Die Aktivität der Superoxiddismutasen wurden mit geringen Modifikationen nach der Methode von Crapo et al. (Crapo, McCord et al. 1978) durchgeführt. In einem Superoxidanionen-generierenden System aus Xanthinoxidase mit Xanthin als Substrat wird die Reduktion von Cytochrom C photometrisch verfolgt. In Abhängigkeit von der in der Probe vorhandenen Aktivität von Superoxiddismutase verläuft die Reduktion von Cytochrom C verlangsamt.

Es wurde in separaten Messungen die Aktivitäten der Gesamt-SOD und nach Hemmung der Cu/Zn-SOD durch Erhöhung der KCN Konzentration auf 1 mM im Ansatz die Aktivität der MnSOD gemessen.

Lösungen:

- 1) 500 mM Kaliumphosphat, 1 mM EDTA pH 7,8 Herstellung aus 1 M Stocklösungen s.o.
- 2) 1 mM Xanthin (Sigma X-0626): 152 mg in 2 ml 1 N NaOH lösen und mit H₂O ad 1 l Lagerung in Aliquots bei -20°C
- 3) Xanthinoxidase (Sigma X-1875) abhängig von der Aktivität vor Gebrauch mit 50 mM Phosphatpuffer aus 1) verdünnen. Lagerung des Konzentrats lichtgeschützt bei +4°C
- 4) 100 µM Cytochrom C (Sigma C-7752). Herstellung einer 1 mM Stocklösung durch Lösen in 50 mM Phosphat-EDTA-Puffer aus 1) und Lagerung in 100 µl Aliquots bei -20°C
Vor Gebrauch Verdünnung 1:10 mit H₂O, lichtgeschützt lagern
- 5) 10mM und 100 µM Kaliumcyanid in H₂O
- 6) SOD-Standard:
Herstellung eines konzentrierten Stocks, ca. 5000 U/ml durch Lösen in 50 mM Phosphat-EDTA-Puffer aus 1),
Aliquotierung à 10 µl, Lagerung bei -20°C

Allgemeiner Ansatz:

Die Messung wurde in einem Gesamtvolumen von 500 µl in 50 mM K-PO₄ Puffer mit 0,1 mM EDTA durchgeführt. Die Endkonzentrationen betragen für Xanthin 100 µM und für Cytochrom C 10 µM. Um eine Beeinflussung der Messung durch Cytochrom-C-Oxidase zu vermeiden, erfolgten die Messungen der Gesamt-SOD in Anwesenheit von 10 µM Kaliumcyanid. Das Superoxidanionen generierende System aus Xanthinoxidase und Xanthin

mußte an jedem Meßtag neu eingestellt werden, da das Enzym nach Verdünnung nicht lange lagerungsstabil ist. Die einzusetzende Menge wurde so gewählt, daß es in Abwesenheit von SOD zu einer Extinktionsänderung von 0,02 Einheiten pro Minute kommt.

Definition der Superoxiddismutase-Aktivität (Crapo, McCord et al. 1978):

1 Unit SOD ist die Menge, die die Extinktionsänderung pro Minute durch Reduktion von Cytochrom C im Reaktionsansatz auf 0,01 Einheiten/min zu halbieren vermag.

Die Messung erfolgte bei einer Wellenlänge von 550 nm im auf 25 °C temperierten Photometer nach Nullabgleich gegen Luft. Die Reaktion wurde durch Zugabe von Xanthinoxidase gestartet. Über einen Zeitraum von 5 Minuten wurde je zweimal pro Minute die Extinktion registriert. Jede Messung wurde als Dreifachbestimmung durchgeführt und gleichzeitig zwei Leerwerte ohne SOD und ein Standard mit 1 U SOD als Kontrollen mitgeführt.

Der Mittelwert der Extinktionsänderung pro min. der 1. bis 4. Minute wurde zur Auswertung verwendet. Anhand der Meßwerte für Standards mit 0,5 U, 0,75 U, 1 U, 1,5 U, 2 U, 3 U SOD wurde eine Standardkurve ermittelt. Die Berechnung der Standardkurve und der Probenaktivitäten erfolgte unter Zuhilfenahme der entsprechenden Funktionen von Microsoft Excel (Version 7.0).

In gleicher Weise wurde die Messung der MnSOD durchgeführt, jedoch betrug die KCN-Konzentration im Ansatz 1 mM, um die Cu/Zn-SOD zu hemmen.

2.15 Statistische Auswertung

Die Ergebnisse wurden als Mittelwerte \pm SEM angegeben.

Aufgrund der Verteilung der Einzelwerte und der Größe des Stichprobenumfanges konnte nicht von einer Normalverteilung ausgegangen werden. Die statistische Auswertung erfolgte deshalb mit dem Kruskal-Wallis Rangsummentest, gefolgt vom Mann-Whitney-u-Test.

Bei einem p-Wert $<0,05$ wurden Unterschiede als signifikant betrachtet.

Die Berechnung der statistischen Tests erfolgte mit dem Computerprogramm GraphPad Prism[®], Version 2.01.

3. Ergebnisse

3.1 Untersuchungen zur chronischen Hyperlipidämie

3.1.1 Basisparameter:

Da nicht bei allen Tieren ausreichend Material für alle Bestimmungen gewonnen werden konnte, werden die jeweiligen n-Zahlen in den Abbildungen in den Säulen und in Tabellen in separaten Spalten angegeben.

Nach 70 bzw. 150 Tagen zeigten Tiere, die die cholesterin- und triglyceridreiche Diät erhalten hatten, keine offensichtlichen Krankheitszeichen. Die Nierenfunktion war, soweit anhand des Serum-Kreatinins beurteilbar, normal und unterschied sich nicht von der der Kontrolltiere.

Das Serum-Cholesterin war bei den fetternährten Tieren erwartungsgemäß deutlich höher als bei den normal ernährten Kontrolltieren. Blutdruckunterschiede zwischen den Gruppen fanden sich nicht (Tab. 3 a, b).

a)

	Serum-Kreatinin [mg/dl]				Serum-Cholesterin [mg/dl]			
	Normalfutter	n	Fettfutter	n	Normalfutter	n	Fettfutter	n
70 Tage	0,73 ± 0,04	9	0,74 ± 0,02	10	109,7 ± 9,54	9	132,3 ± 5,82 *	9
150 Tage	0,70 ± 0,02	7	0,78 ± 0,03	7	71,3 ± 4,8 °	7	174,1 ± 12,4 *°	7

b)

	Systolischer Blutdruck [mmHg]				Körpergewicht [g]			
	Normalfutter	n	Fettfutter	n	Normalfutter	n	Fettfutter	n
70 Tage	94,0 ± 3,06	10	100,5 ± 2,41	10	469,7 ± 9,25	10	489,0 ± 15,1	10
150 Tage	85,7 ± 4,93	7	97,9 ± 2,14	7	513,3 ± 15,2 °	7	591,0 ± 17,4 *°	7

* p < 0,05 vs. Kontrolle
° p < 0,05 vs. 70 Tage derselben Diät

Table 3 a, b:

Allgemeine klinische und klinisch-chemische Parameter bei normal oder cholesterin- und triglyceridreich ernährten uninephrektomierten Wistar-Ratten im chronischen Experiment

Nach 70 Tagen kam es unter der cholesterin- und triglyceridreichen Diät zu einer Verdopplung der Eiweißausscheidung im Urin und nach 150 Tage zu einer Versechsfachung. Die normal ernährten Kontrollen zeigten zu beiden Untersuchungszeitpunkten keine unterschiedliche Proteinurie (Abb. 3).

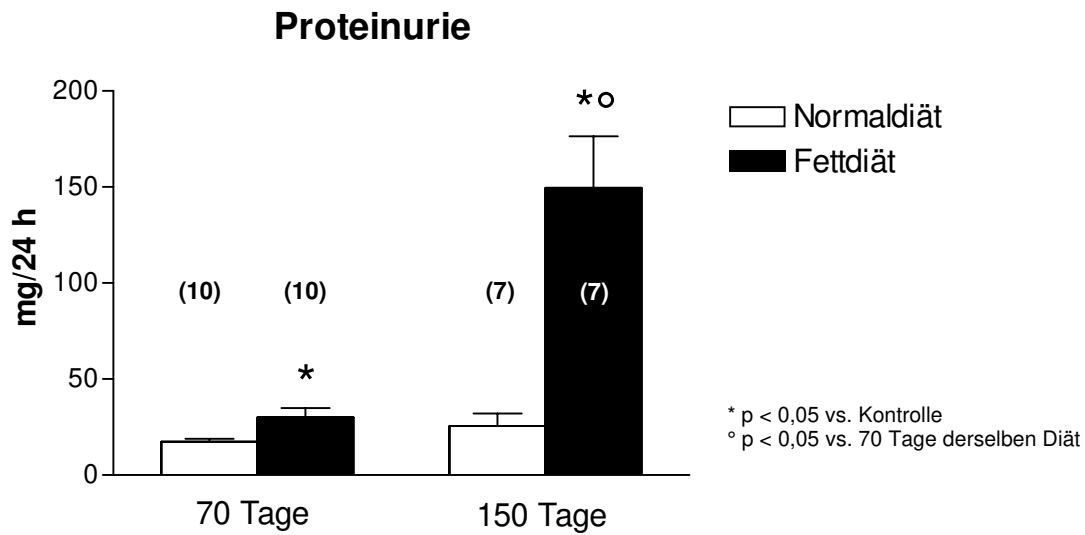


Abbildung 3:

Eiweißausscheidung im 24 h Sammelurin bei normal oder cholesterin- und triglyceridreich ernährten uninephrektomierten Wistar-Ratten im chronischen Experiment

3.1.2 Histologische Untersuchungen:

Die glomerulären Veränderungen (Tabelle 4 a, b) waren nach 70 Tagen Fettdiät noch mild ausgeprägt und viele Glomerula lichtmikroskopisch völlig normal. Glomeruläre Sklerosen waren noch nicht gesteigert, es ließ sich jedoch schon eine signifikante Steigerung der mesangialen Zellzahl und eine beginnende mesangiale Sklerosierung nachweisen.

Nach 150 Tagen war beides auch in den Kontrollen gegenüber den jüngeren Tieren signifikant gesteigert. Die Tiere nach 150 Tagen Fettdiät zeigten demgegenüber eine bereits deutlich ausgeprägte mesangiale Proliferation, sowie gehäuft segmentale Sklerosen (Tafel 1), bis hin zu global vernarbten Glomerula. Bei proteinurischen Tieren fanden sich mit Proteintröpfchen angefüllte Podozyten (Tafel 1d). Bei den Tieren mit dietätisch induzierter Hyperlipidämie war nach 70 Tagen Fettdiät eine gesteigerte Anzahl an Monozyten / Makrophagen in Glomerula nachweisbar (Tab 4 a, b).

a)

	ED1 pos. Zellzahl [Zellen / glom. Querschnitt]				Glomeruläre Sklerose [Score]			
	Normalfutter	<i>n</i>	Fettfutter	<i>n</i>	Normalfutter	<i>n</i>	Fettfutter	<i>n</i>
70 Tage	1.37 ± 0.32	10	4.47 ± 0.78 *	10	0.10 ± 0.1	10	1.40 ± 0.98	10
150 Tage	2.20 ± 0.85	7	7.79 ± 2.12 *	7	1.14 ± 0.14	7	8.14 ± 3.16 °*	7

b)

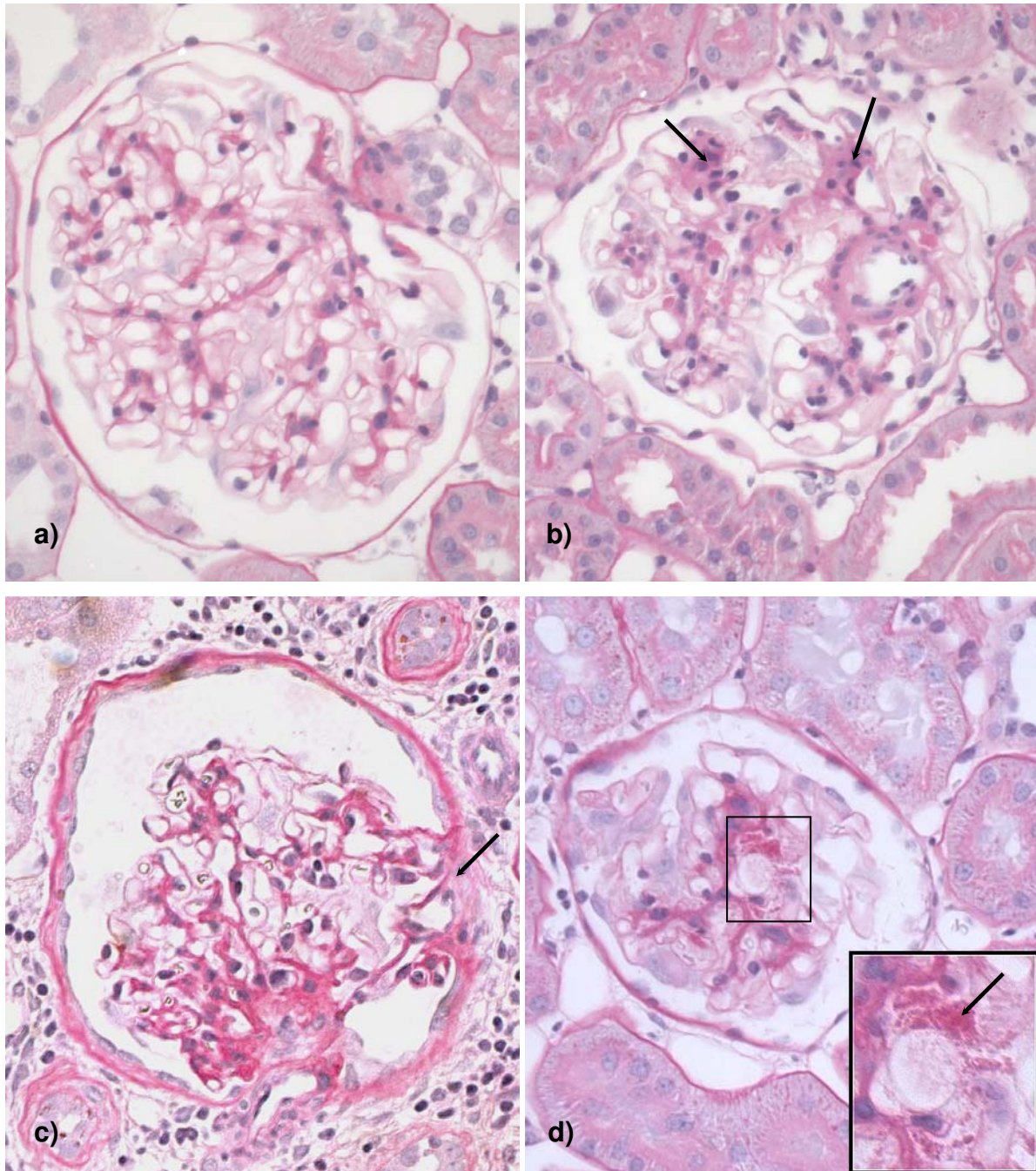
	Mesangiale Proliferation [Score]				Mesangiale Sklerose [Score]			
	Normalfutter	<i>n</i>	Fettfutter	<i>n</i>	Normalfutter	<i>n</i>	Fettfutter	<i>n</i>
70 Tage	6.70 ± 1.26	10	36.33 ± 12.7 *	10	5.60 ± 0.99	10	24.11 ± 8.98 *	10
150 Tage	13.29 ± 1.23 °	7	47.43 ± 8.2 *	7	13.57 ± 1.36 °	7	65.71 ± 9.81 °*	7

* $p < 0,05$ vs. Kontrolle

° $p < 0,05$ vs. 70 Tage derselben Diät

Tabelle 4 a, b:

Glomeruläre Histopathologie bei normal oder cholesterin- und triglyceridreich ernährten uninephrektomierten Wistar-Ratten im chronischen Experiment



Tafel 1 a-d, Glomeruläre Histopathologie

Glomeruläre Veränderungen bei männlichen uninephrektomierten Wistar-Ratten nach 150 Tagen cholesterin- und triglyceridreicher Ernährung (PAS-Färbung, 400fache Vergrößerung)

a) normales Glomerulum von einem einseitig nephrektomierten Kontrolltier,

b) deutliche Zeichen einer Verbreiterung des Mesangiums und mesangiale Zellvermehrung (siehe Pfeile),

c) segmentale glomeruläre Sklerose (Pfeil),

d) Vakuolisierung der Podozyten mit Proteintröpfchen (vergl. Ausschnittsvergrößerung).

Nach 70 Tagen cholesterin- und triglyceridreicher Diät waren die interstitiellen Veränderungen, in der Regel noch gering ausgeprägt, aber schon signifikant nachweisbar, nach 150 Tagen deutlich ausgeprägt.

Um Hinweise über den Grad interstitieller Zellvermehrung zu gewinnen, wurde die Gesamtzahl interstitieller Zellen wie Fibroblasten und infiltrierender Lymphozyten ausgezählt. Diese war zu beiden Untersuchungszeitpunkten bei den hyperlipidämischen Tieren gegenüber den Kontrolltieren signifikant gesteigert (Tab. 5). Die interstitielle Zellzahl zeigte im zeitlichen Verlauf in beiden Diätgruppen keine signifikante Änderung.

Die tubulointerstitielle Schädigung wurde morphometrisch bestimmt. Bereits nach 70 Tagen Fettdiät war ein tubulointerstitieller Schaden im Sinne einer interstitiellen Fibrose und Tubulusatrophie bei einzelnen Tieren nachweisbar. Dieser Unterschied erreichte jedoch nicht statistische Signifikanz.

Nach 150 Tagen Fettdiät war die tubulointerstitielle Schädigung jedoch deutlich ausgeprägt und statistisch signifikant (Tab. 5) (Tafel 2).

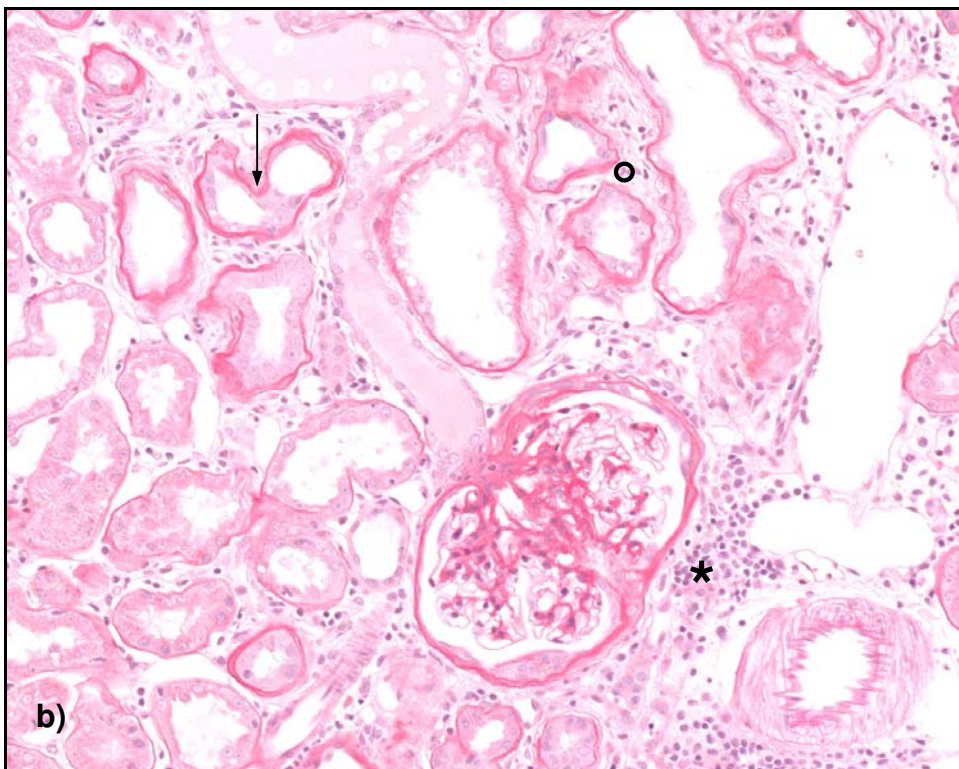
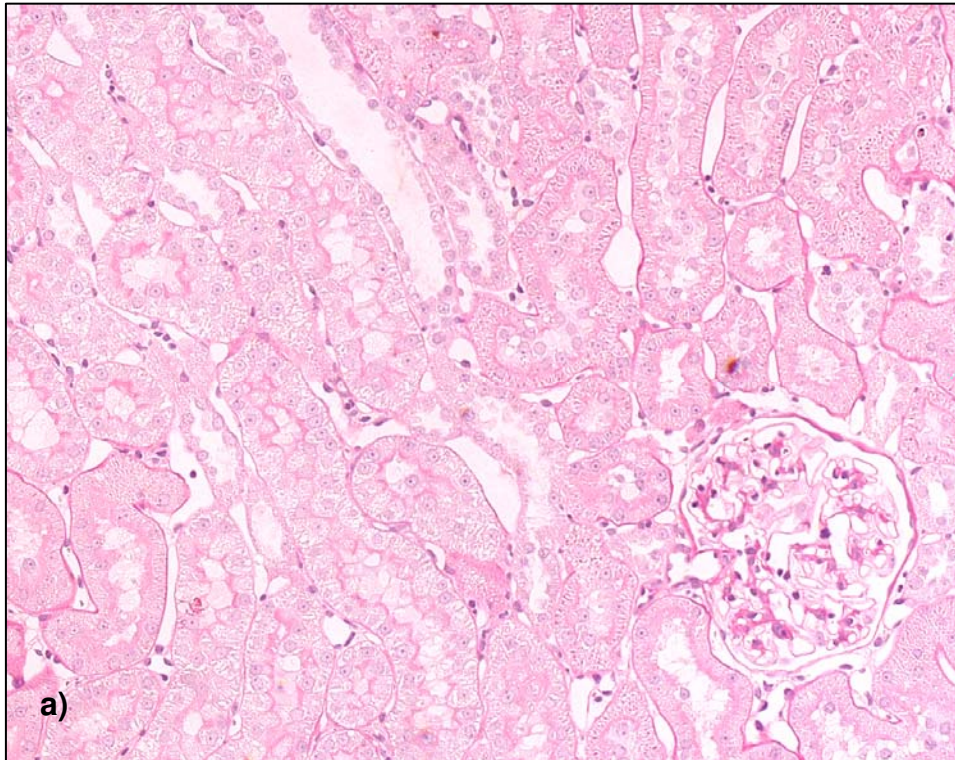
	Interstitielle Zellzahl [Zellen/Gesichtsfeld]				Tubulointerstieller Schaden [% der corticalen Fläche]			
	Normalfutter	<i>n</i>	Fettfutter	<i>n</i>	Normalfutter	<i>n</i>	Fettfutter	<i>n</i>
70 Tage	45.46 ± 2.62	10	60.48 ± 5.46 *	10	0.02 ± 0.01	10	0.53 ± 0.28	10
150 Tage	43.04 ± 1.75	7	79.19 ± 10.9 *	7	0.06 ± 0.04	7	3.35 ± 0.85 *°	7

* $p < 0,05$ vs. Kontrolle

° $p < 0,05$ vs. 70 Tage derselben Diät

Table 5:

Interstitielle Veränderungen in Nieren von normal oder cholesterin- und triglyceridreich ernährten uninephrektomierten Wistar-Ratten im chronischen Experiment



Tafel 2 a, b: Tubulointerstitielle Veränderungen

Gegenüber Kontrolltieren (a) zeigten Tiere nach 150 Tagen chronischer Hyperlipidämie (b) ausgeprägte tubulointerstitielle Veränderungen mit atrophischen Tubuli (Pfeil), interstitieller Matrixvermehrung (°) und einem schüttereren interstitiellen Infiltrat sowie perivascular dichten Rundzellinfiltrationen (*). Die zugehörigen Glomerula wiesen zum Teil fokale segmentale Vernarbungen auf (siehe auch Tafel 1).

Nach 70 Tagen Fettdiät fanden sich bereits signifikant mehr Monozyten / Makrophagen im kortikalen Interstitium (Abb. 3). Nach 150 Tagen war stellenweise ein dichtes Infiltrat nachweisbar.

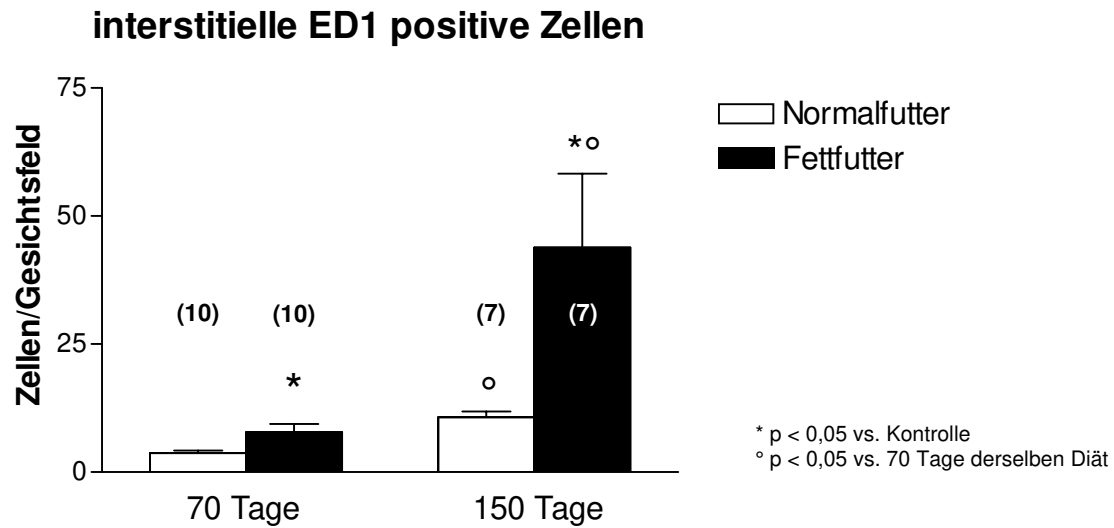


Abbildung 4:

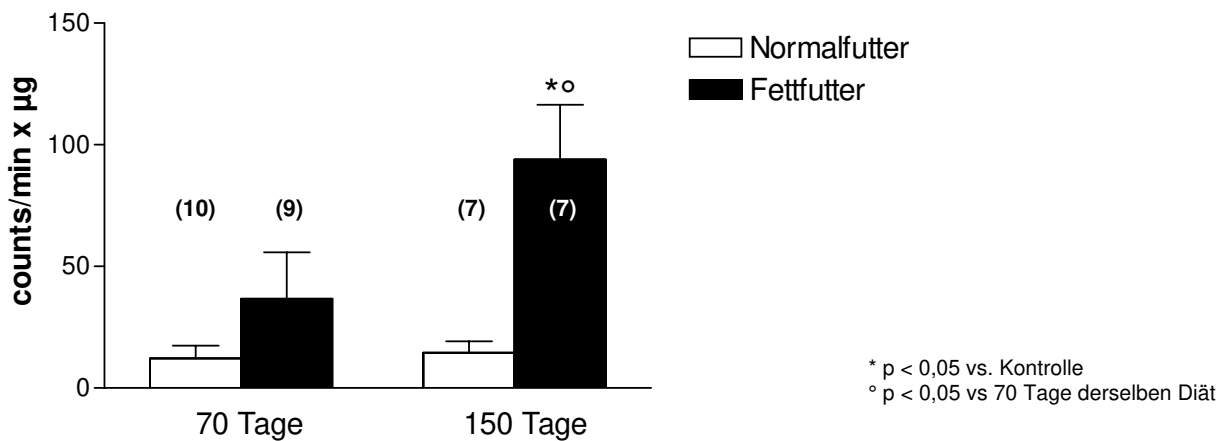
Das kortikale Interstitium infiltrierende Monozyten / Makrophagen bei normal oder cholesterin- und triglyceridreich ernährten uninephrektomierten Wistar-Ratten im chronischen Experiment

3.1.3. Reaktive Sauerstoffspezies in Glomerula

Die Messungen der reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) in frisch isolierten Glomerula zeigten generell einen Trend zur vermehrten Chemilumineszenz bei den fetternährten Tieren unabhängig davon, ob Luminol oder Lucigenin als Detektor eingesetzt wurde. Dieser Trend war schon nach 70 Tagen Fettdiät nachvollziehbar, ohne bei großer Streuung jedoch statistische Signifikanz zu erreichen. Nach 150 Tagen Fettdiät war die Chemilumineszenz jedoch mit beiden Substanzen signifikant gesteigert.

a)

Chemilumineszenz mit Luminol in Glomerula



b)

Chemilumineszenz mit Lucigenin in Glomerula

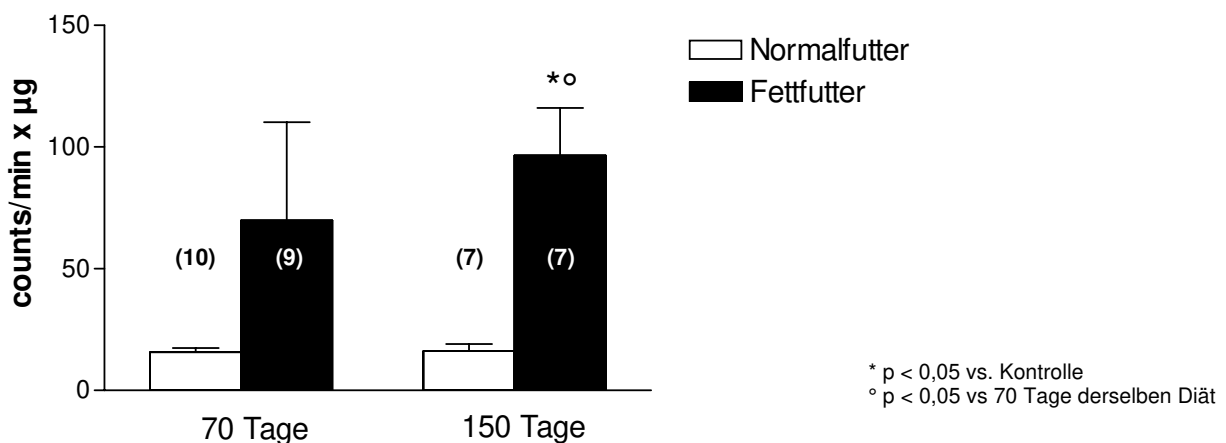


Abbildung 5 a, b:

ROS gemessen als Luminol- (a) oder Lucigenin-vermittelte (b) Chemilumineszenz in frisch isolierten Glomerula von normal oder cholesterin- und triglyceridreich ernährten uninephrektomierten Wistar-Ratten im chronischen Experiment.

3.1.4 Oxidative und antioxidative Enzyme in Glomerula

Die Untersuchung der oxidativen Enzyme in Glomerula zeigte eine signifikante Steigerung der Aktivität der Xanthinoxidase nach 150 Tagen Fettdiät. Bereits nach 70 Tagen Fettdiät war ein Trend zu erhöhten Werten erkennbar, ohne jedoch statistische Signifikanz zu erreichen.

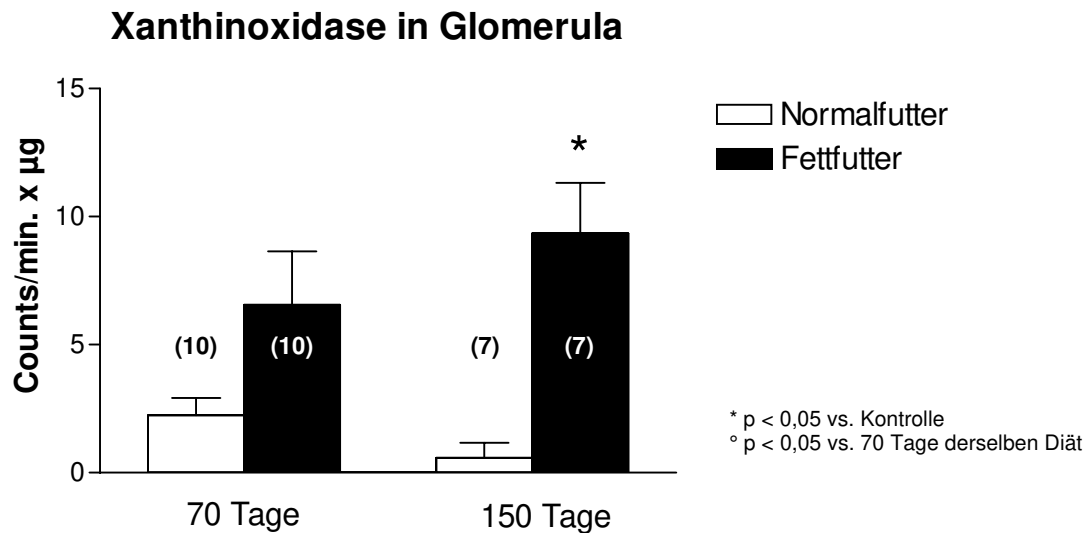


Abbildung 6:

Xanthinoxidaseaktivität in isolierten Glomerula von normal oder cholesterin- und triglyceridreich ernährten uninephrektomierten Wistar-Ratten im chronischen Experiment.

NADH und NADPH-Oxidasen zeigten zwischen den Diäten keine signifikanten Unterschiede. Ältere Tiere hatten jedoch unabhängig von der Diätform eine niedrigere Enzymaktivität.

	NADH-Oxidasen [counts/min x µg Protein]				NADPH-Oxidasen [counts/min x µg Protein]			
	Normalfutter	n	Fettfutter	n	Normalfutter	n	Fettfutter	n
70 Tage	954.0 ± 175	10	849.2 ± 197	10	311.5 ± 54.3	10	251.7 ± 49.9	10
150 Tage	402.5 ± 85.3	7	447.6 ± 109 °	7	114.4 ± 22.1 °	7	144.8 ± 32.1 °	7

* p < 0,05 vs. Kontrolle
° p < 0,05 vs. 70 Tage derselben Diät

Tabelle 6:

Aktivität von NADH- und NADPH-Oxidasen in isolierten Glomerula von normal oder cholesterin- und triglyceridreich ernährten uninephrektomierten Wistar-Ratten im chronischen Experiment

Bei den antioxidativen Enzymen fanden sich in Glomerula von älteren Tieren nahezu bei allen untersuchten Enzymen signifikant niedrigere Aktivitäten, wohingegen keine Unterschiede zwischen den Diäten auftraten (Tab. 7 a, b).

a)

	Gesamt SOD [mU/μg Protein]				MnSOD [mU/μg Protein]			
	Normalfutter	<i>n</i>	Fettfutter	<i>n</i>	Normalfutter	<i>n</i>	Fettfutter	<i>n</i>
70 Tage	23.9 ± 2	10	21.1 ± 1.25	7	11.5 ± 2.62	7	8.8 ± 0.9	8
150 Tage	17.4 ± 1.52 °	5	13.6 ± 1.83 °	6	5.8 ± 0.87 °	5	3.9 ± 0.74 °	5

b)

	Glutathionperoxidase [pmol NADPH/min x mg Protein]				Catalase [μMol H ₂ O ₂ /min x mg Protein]			
	Normalfutter	<i>n</i>	Fettfutter	<i>n</i>	Normalfutter	<i>n</i>	Fettfutter	<i>n</i>
70 Tage	219.4 ± 21	10	228.3 ± 19.4	9	56.2 ± 6.19	10	58.7 ± 7.5	9
150 Tage	153.3 ± 28.7	7	141.6 ± 25.6 °	7	29.0 ± 2.94 °	7	35.7 ± 5.23	7

* p < 0,05 vs. Kontrolle

° p < 0,05 vs. 70 Tage derselben Diät

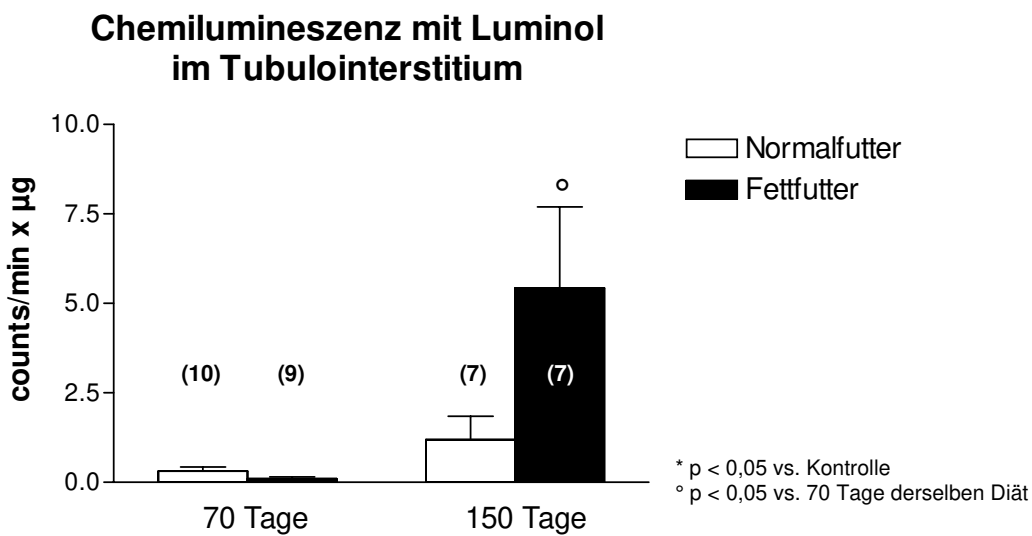
Tabelle 7 a, b:

Antioxidative Enzyme in isolierten Glomerula von normal oder cholesterin- und triglyceridreich ernährten uninephrektomierten Wistar-Ratten im chronischen Experiment

3.1.5. Reaktive Sauerstoffspezies im Tubulointerstitium

Im Tubulointerstitium zeigte die Messung von ROS nach 70 Tagen cholesterin- und triglyceridreicher Diät keine Unterschiede. Wie auch in Glomerula war die Chemilumineszenz mit Lucigenin nach 150 Tagen Fettdiät signifikant gesteigert. Bei der Messung mit Luminol streuten die Ergebnisse stark, so daß statistische Signifikanz im Vergleich zu normalernährten Tieren nicht erreicht wurde. Mit beiden Detektorsubstanzen war die Chemilumineszenz nach 150 Tagen Fettdiät jedoch signifikant höher als nach 70 Tagen (Abb. 7).

a)



b)

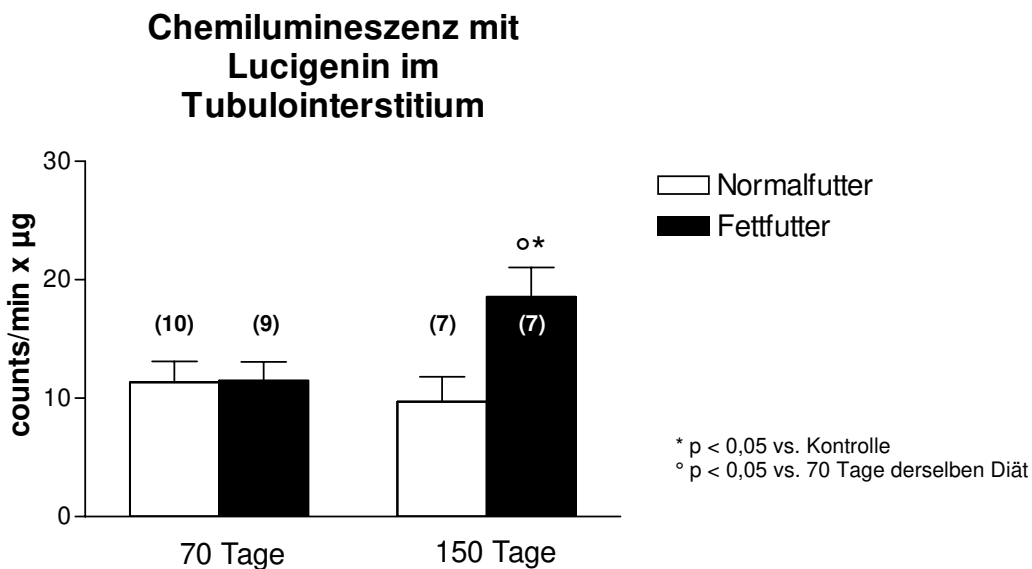


Abbildung 7 a, b:

ROS gemessen als Luminol- (a) oder Lucigenin-vermittelte (b) Chemilumineszenz in frisch isoliertem tubulointerstitiellem Nierengewebe von normal oder cholesterin- und triglyceridreich ernährten Wistar-Ratten im chronischen Experiment

3.1.6 Oxidative und antioxidative Enzyme im Tubulointerstitium

Anders als bei der Messung der ROS, zeigte sich bereits nach 70 Tagen cholesterin- und triglyceridreicher Diät eine signifikante Steigerung der Xanthinoxidaseaktivität im Tubulointerstitium bei den Tieren mit diätätisch induzierter Hyperlipidämie (Abbildung 8).

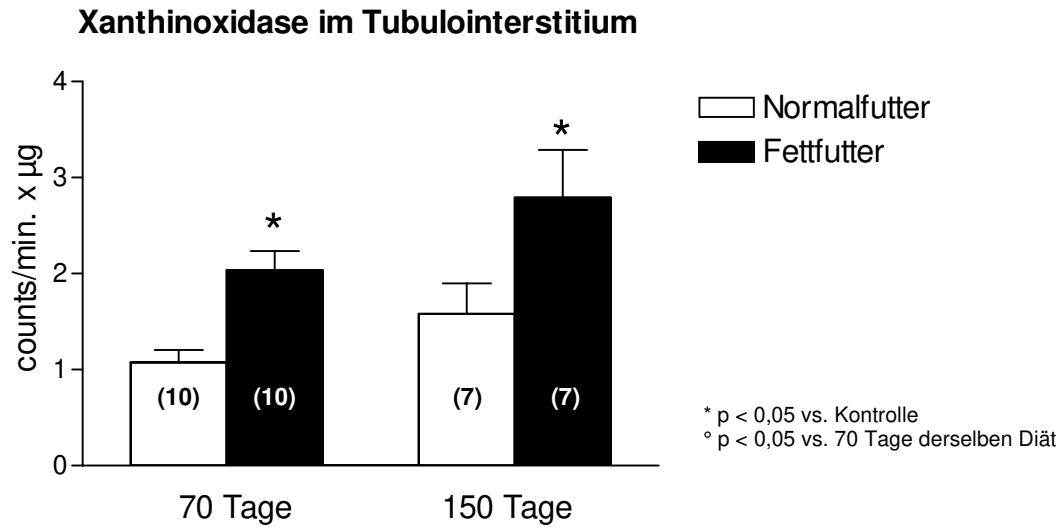


Abbildung 8:

Xanthinoxidaseaktivität in isoliertem tubulointerstitiellem Nierengewebe von normal oder cholesterin- und triglyceridreich ernährten uninephrektomierten Wistar-Ratten im chronischen Experiment

Wie in den Untersuchungen der Glomerula ergaben sich bei der Messung der NADH- und NADPH-Oxidasen im Tubulointerstitium keine signifikanten Unterschiede zwischen den Diätformen. Auch im tubulointerstitiellen Gewebe fiel jedoch auf, daß die älteren Tiere insgesamt niedrigere Enzymaktivitäten aufwiesen (Tabelle 8).

	NADH-Oxidasen [counts/min x µg Protein]				NADPH-Oxidasen [counts/min x µg Protein]			
	Normalfutter	<i>n</i>	Fettfutter	<i>n</i>	Normalfutter	<i>n</i>	Fettfutter	<i>n</i>
70 Tage	3965 ± 686	10	5968 ± 1216	10	1138 ± 137	10	1739 ± 332	10
150 Tage	2972 ± 195	7	2338 ± 311 °	7	835 ± 106 °	7	809 ± 115 °	7

° *p* < 0,05 vs. 70 Tage derselben Diät

Tabelle 8:

Aktivität von NADH- und NADPH-Oxidasen in tubulointerstitiellem Nierengewebe von normal oder cholesterin- und triglyceridreich ernährten uninephrektomierten Wistar-Ratten

Die antioxidativen Enzyme im tubulointerstitiellen Gewebe zeigten uneinheitliche Ergebnisse.

Die Superoxiddismutaseaktivitäten waren im Tubulointerstitium unabhängig von der Diät weitestgehend unverändert.

	Gesamt SOD [mU/µg Protein]				MnSOD [mU/µg Protein]			
	Normalfutter	<i>n</i>	Fettfutter	<i>n</i>	Normalfutter	<i>n</i>	Fettfutter	<i>n</i>
70 Tage	46.4 ± 5.02	10	47.9 ± 9.28	10	15 ± 1.68	10	20 ± 4.53	10
150 Tage	29.8 ± 1.80 °	7	34.6 ± 5.88	7	12 ± 1.2	7	15 ± 1.92	7

° *p* < 0,05 vs. 70 Tage derselben Diät

Tabelle 9:

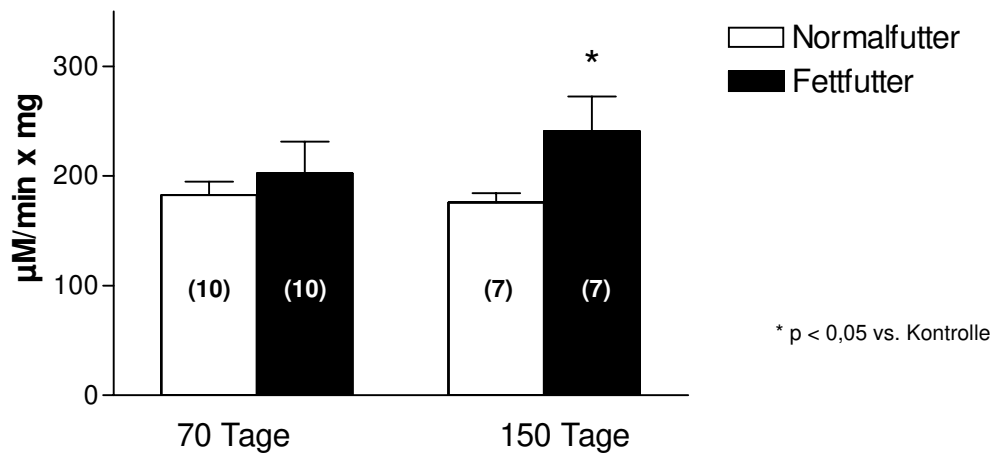
Superoxiddismutaseaktivitäten in tubulointerstitiellem Nierengewebe von normal oder cholesterin- und triglyceridreich ernährten Wistar-Ratten

Bei hypercholesterinämischen Tieren war die Aktivität der Catalase im Tubulointerstitium nach 150 Tagen signifikant gesteigert (Abbildung 9a).

Ein ähnliches Bild wie für die Catalase fand sich für die Aktivität der Glutathionperoxidase (Abbildung 9 b), die bei cholesterin- und triglyceridreich ernährten Tieren zu beiden Untersuchungszeitpunkten signifikant gegenüber den Kontrolltieren gesteigert war

a)

Catalase im Tubulointerstitium



b)

Glutathionperoxidase im Tubulointerstitium

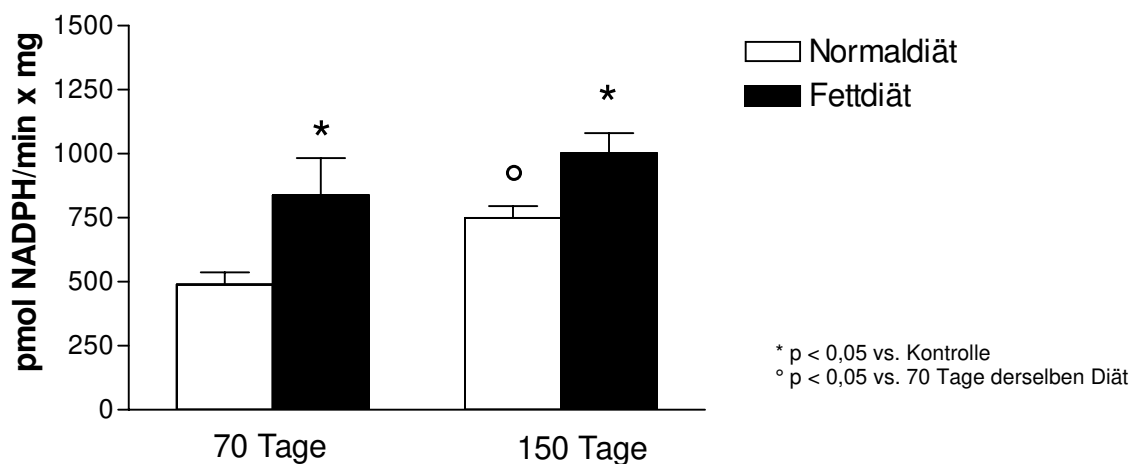


Abbildung 9 a, b:

Aktivität der Catalase (a) und Glutathionperoxidase (b) in isoliertem tubulointerstitiellem Nierengewebe von normal oder cholesterin- und triglyceridreich ernährten Wistar-Ratten im chronischen Experiment

3.1.7 Zusammenfassung 1:

In diesem Teil der Arbeit konnte folgendes gezeigt werden:

- Diätetisch erzeugte Hyperlipidämie führt im Rattenmodell zu deutlicher Proteinurie, die nach 150 Tagen ausgeprägter ist als nach 70 Tagen
- Es entwickelt sich eine tubulointerstitielle Schädigung mit infiltrierenden Monozyten / Makrophagen, gesteigerter interstitieller Zellzahl, Tubulusatrophie und interstitieller Matrixvermehrung, die ebenfalls zum späten Untersuchungszeitpunkt ausgeprägter ist.
- Im Glomerulum führt Hypercholesterinämie zu mesangialer Sklerose, Zellvermehrung und fokal - segmentalen Glomerulosklerosen, die abgesehen von der mesangialen Zellvermehrung zum späten Untersuchungszeitpunkt ausgeprägter ist.
- Langfristige Hypercholesterinämie geht mit gesteigerten lokalen Mengen von ROS in Glomerula und im Tubulointerstitium einher. Die Aktivität der Xanthinoxidase ist sowohl in Glomerula als auch im Tubulointerstitium gesteigert.
- Die antioxidativen Enzyme sind bei chronischer Hyperlipidämie in Glomerula unverändert. Im Tubulointerstitium findet sich jedoch eine Steigerung der Aktivität der Catalase und der Glutathionperoxidase.
- Offen bleibt jedoch, inwieweit die beobachtete Steigerung der ROS im Gewebe für die beobachteten histologischen und funktionellen Veränderungen ursächlich ist, oder ob es sich um ein Epiphänomen handelt.

3.2 Untersuchungen zur kurzfristigen Hyperlipidämie und zur Adriamycin-Nephropathie

Um die Frage zu klären, ob das vermehrte Auftreten von ROS möglicherweise kausal für die Entstehung der in Kapitel 3.1 beschriebenen Veränderungen ist, wurden Versuche zu einem sehr frühen Zeitpunkt durchgeführt, zu dem noch nicht mit schwerwiegenden histologischen und funktionellen Schäden zu rechnen war. Zudem wurde ein Modell eines nephrotischen Syndroms gewählt, um zu untersuchen, ob auch eine Hyperlipidämie anderer Ursache mit Veränderungen im Auftreten von ROS und der möglicherweise beteiligten Enzyme einhergeht.

3.2.1 Basisparameter:

Die Versuche zur kurzzeitigen diätetisch induzierten Hyperlipidämie und zum nephrotischen Syndrom wurden zeitgleich durchgeführt. Für beide Experimente dienten gleichaltrige, unbehandelte, mit Normalfutter ernährte Tiere als gemeinsame Kontrolle.

Wie bei den Experimenten zur chronischen Hyperlipidämie zeigten auch die Tiere im kurzfristigen Versuch keine offensichtlichen Krankheitszeichen. Die Nierenfunktion war, beurteilt anhand des Serum-Kreatinins, in allen Gruppen unverändert (Tab. 10). Eine Proteinurie trat bei kurzzeitiger Hyperlipidämie nicht auf. Erwartungsgemäß zeigten die Tiere nach Adriamycin-Injektion eine schwere Proteinurie (Tab. 11).

a)

	Serumkreatinin [mg/dl]			
	Fettfutter	<i>n</i>	Kontrolle	<i>n</i>
21 Tage	0,52 ± 0,01	6	0,49 ± 0,02	3
35 Tage	0,60 ± 0,01	18	0,57 ± 0,02	12
35 Tage Wolfram	0,61 ± 0,02	11	0,57 ± 0,02	4

b)

	Serumkreatinin [mg/dl]			
	Adriamycin	<i>n</i>	Kontrolle	<i>n</i>
14 Tage	0,48 ± 0,03	3	0,49 ± 0,02	3
28 Tage	0,53 ± 0,02	8	0,57 ± 0,02	12

Table 10 a, b:

Serum-Kreatinin von Tieren mit diätetisch induzierter Hyperlipidämie und mit inhibierter Xanthinoxidaseaktivität (a), sowie Tieren mit Adriamycin-Nephropathie (b)

a)

	Proteinurie [mg] / 24 h			
	Fettfutter	<i>n</i>	Kontrolle	<i>n</i>
21 Tage	18,35 ± 2,21	8	14,53 ± 1,40	9
35 Tage	11,90 ± 1,18	20	19,92 ± 2,60	14
35 Tage Wolfram	14,61 ± 1,9	11	14,96 ± 0,70	5

b)

	Proteinurie [mg] / 24 h			
	Adriamycin	<i>n</i>	Kontrolle	<i>n</i>
14 Tage	265,5 ± 37,2 *	8	14,53 ± 1,40	9
28 Tage	372,2 ± 56,9 *	8	19,92 ± 2,60	14

* p < 0,05 vs. Kontrolle

Table 11 a, b:

Proteinurie von Tieren mit diätetisch induzierter Hyperlipidämie und mit inhibierter Xanthinoxidaseaktivität (a), sowie Tieren mit Adriamycin-Nephropathie (b)

Die Behandlung der Tiere mit der Fettdiät führte bereits nach drei Wochen zu einem Anstieg der Triglyceride und nach 35 Tagen auch des Cholesterins. Zum Zeitpunkt 21 Tage konnten jedoch lediglich von drei Kontrolltieren Sera gewonnen werden. Für diesen Zeitpunkt ist daher eine sinnvolle statistische Auswertung der Serumparameter nicht möglich.

Die Adriamycin - behandelten Tiere zeigten im Rahmen des sich entwickelnden nephrotischen Syndroms deutlich erhöhte Triglycerid- und Cholesterinwerte (Tab. 12 b und 13 b).

	Serumcholesterin [mg/dl]			
	Fettfutter	n	Kontrolle	n
21 Tage	106,6 ± 11,5	8	70,3 ± 4,7	3
35 Tage	104,1 ± 4,5 *	20	68,2 ± 3,7	12
35 Tage Wolfram	92,6 ± 7,1 #	11	46,3 ± 5,0	4

	Serumcholesterin [mg/dl]			
	Adriamycin	n	Kontrolle	n
14 Tage	233,0 ± 19,5	3	70,3 ± 4,7	3
28 Tage	253,8 ± 33,6 *	8	68,2 ± 3,7	12

* p < 0,05 vs. Kontrolle
p < 0,05 vs. 35 Tage ohne Wolfram

Table 12 a, b:

Serumcholesterin von Tieren mit diätetisch induzierter Hyperlipidämie und inhibierter Xanthinoxidaseaktivität (a), sowie Tieren mit Adriamycin-Nephropathie (b)

	Serumtriglyceride [mg/dl]			
	Fettfutter	n	Kontrolle	n
21 Tage	80,8 ± 12,2	8	31,7 ± 13,2	3
35 Tage	74,0 ± 5,7	20	63,7 ± 9,7	12
35 Tage Wolfram	149,9 ± 25,2 #	11	46,3 ± 5,0	4

	Serumtriglyceride [mg/dl]			
	Adriamycin	n	Kontrolle	n
14 Tage	211,3 ± 57,0	3	31,7 ± 13,2	3
28 Tage	190,4 ± 30,6 *	8	63,7 ± 9,7	12

* p < 0,05 vs. Kontrolle
p < 0,05 vs. 35 Tage ohne Wolfram

Table 13 a, b:

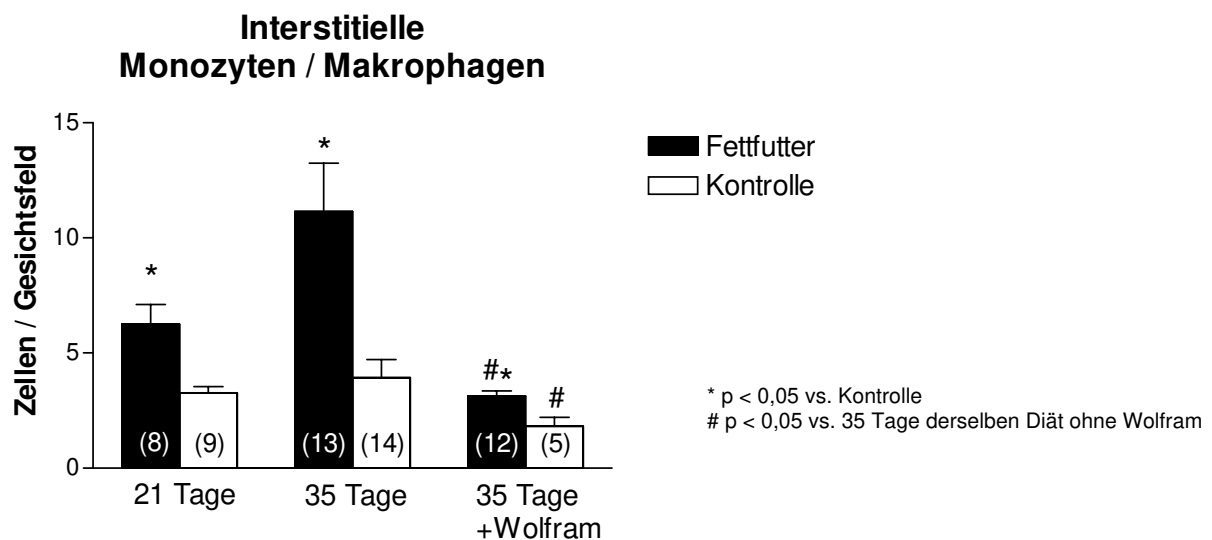
Serum-Triglyceride von Tieren mit diätetisch induzierter Hyperlipidämie und inhibierter Xanthinoxidaseaktivität (a), sowie Tieren mit Adriamycin-Nephropathie (b)

3.2.2 Histologische Untersuchungen:

Bereits nach 21 Tagen Fettdiät war eine signifikante interstitielle Infiltration mit Monozyten und Makrophagen nachweisbar, die nach 35 Tagen noch weiter zunahm.

Unter dauerhafter oraler Applikation von Wolfram über das Trinkwasser zur Hemmung der Xanthinoxidase blieb die Infiltration mit Monozyten / Makrophagen aus. Die ermittelten Zellzahlen lagen bei normal ernährten Tieren sogar unter dem Niveau der Kontrolltiere. Tiere mit Adriamycin-Nephrose zeigten ebenfalls signifikant gesteigerte Infiltration mit Monozyten / Makrophagen (Abbildung 10, Tafel 3).

a)



b)

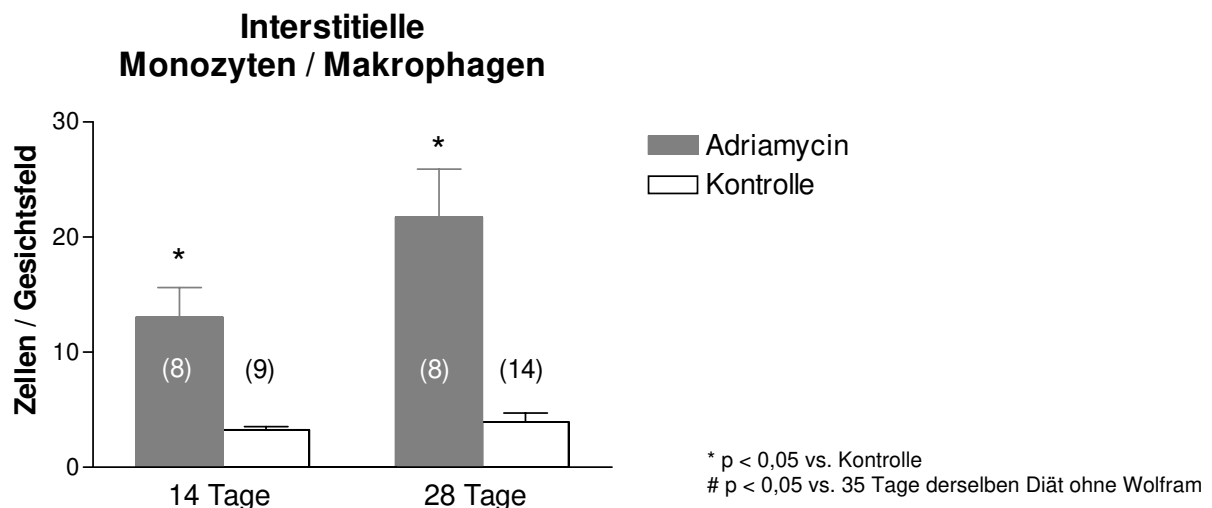
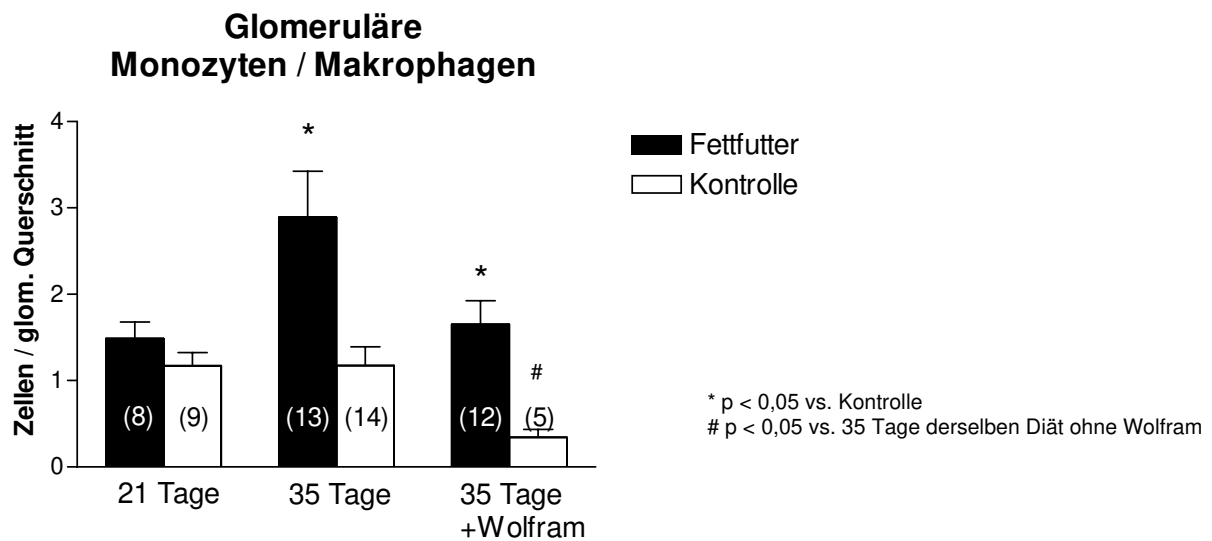


Abbildung 10 a, b:

Das kortikale Tubulointerstitium infiltrierende Monozyten / Makrophagen in Nieren von Tieren mit diätetisch induzierter Hyperlipidämie sowie mit inhibierter Xanthinoxidaseaktivität (a) und in Tieren mit Adriamycin-Nephropathie (b)

In Glomerula war erst nach 35 Tagen Fettdiät eine signifikante Steigerung der Zahl der Monozyten / Makrophagen nachzuweisen. Die Behandlung der Tiere mit Wolfram führte bei den normal ernährten Tieren zu einer signifikanten Reduktion der Zahl der Monozyten / Makrophagen in Glomerula. Bei den hyperlipidämischen Tieren mit Wolframbehandlung wurde ein statistisch signifikanter Unterschied nicht erreicht (Abb. 11 a). Im Modell der Adriamycin-nephrose fanden sich erst vier Wochen nach der Injektion signifikant mehr ED1 positive Zellen in den Glomerula (Abb. 11 b)

a)



b)

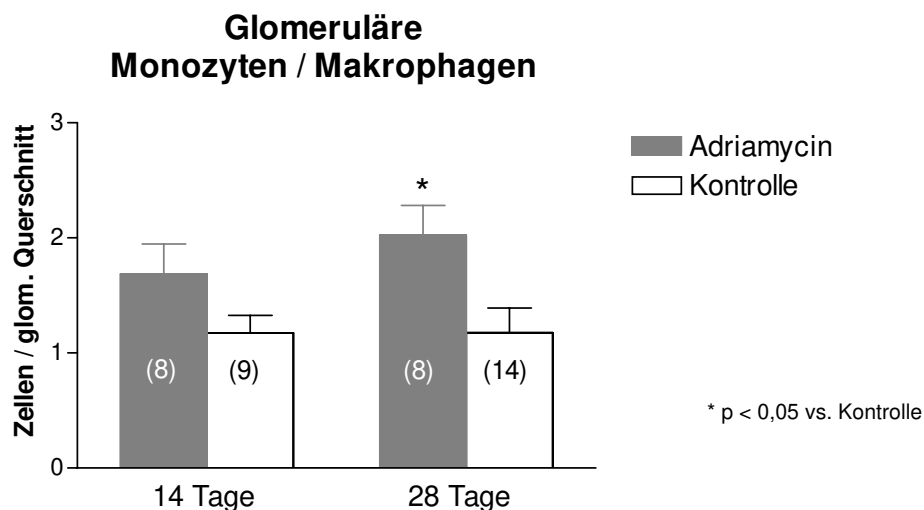
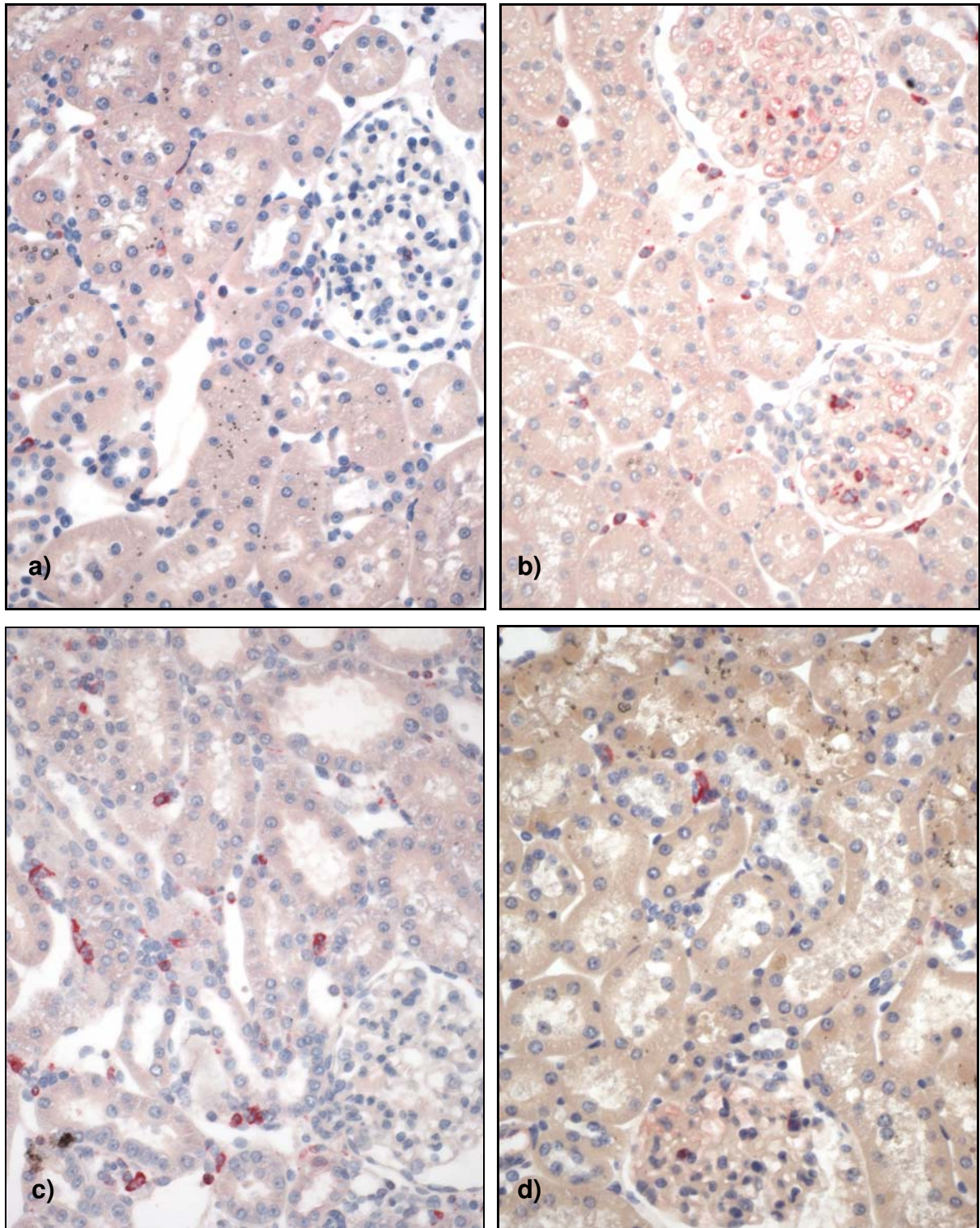


Abbildung 11 a, b:

Die Glomerula infiltrierende Monozyten / Makrophagen in Nieren von Tieren mit diätetisch induzierter Hyperlipidämie sowie mit inhibierter Xanthinoxidaseaktivität (a) und in Tieren mit Adriamycin-Nephropathie (b)



Tafel 3: Interstitielle infiltrierende Monozyten / Makrophagen

Gegenüber den Kontrolltieren (a) zeigten Tiere nach 35 Tagen Fettdiät (b) ein vermehrtes interstitielles Infiltrat mit Monozyten / Makrophagen. Bei Tieren mit Adriamycin-Nephropathie (c) war ebenfalls ein deutliches Infiltrat vorhanden. In Tieren mit Fettdiät und Wolfram-Behandlung (d) fanden sich demgegenüber nur einzelne Monozyten / Makrophagen.

Die kurzzeitige, diätetisch induzierte Hypercholesterinämie und Hypertriglyceridämie führte weder zu einer gesteigerten tubulären noch interstitiellen Proliferation, wie die Auswertung Bromdeoxyuridinmarkierter Zellen ergab.

Bei den Tieren mit nephrotischem Syndrom im Modell der Adriamycin-Nephrose zeigte sich jedoch zu beiden Untersuchungszeitpunkten eine deutlich gesteigerte tubuläre Proliferation (Tab. 14 b). Daneben war 14 Tage nach der Injektion auch eine gesteigerte interstitielle Proliferation nachweisbar (Tab. 15 b).

	BrdU markierte interstitielle Zellen [Zellen/Gesichtsfeld]					BrdU markierte interstitielle Zellen [Zellen/Gesichtsfeld]			
	Fettfutter	<i>n</i>	Kontrolle	<i>n</i>		Adriamycin	<i>n</i>	Kontrolle	<i>n</i>
21 Tage	1,8 ± 0,31	8	1,2 ± 0,21	8	14 Tage	5,5 ± 1,7 *	6	1,2 ± 0,21	8
35 Tage	1,1 ± 0,2	7	0,8 ± 0,13	7	28 Tage	2,7 ± 0,9	8	0,8 ± 0,13	7

* p < 0,05 vs. Kontrolle

Tabelle 14 a, b:

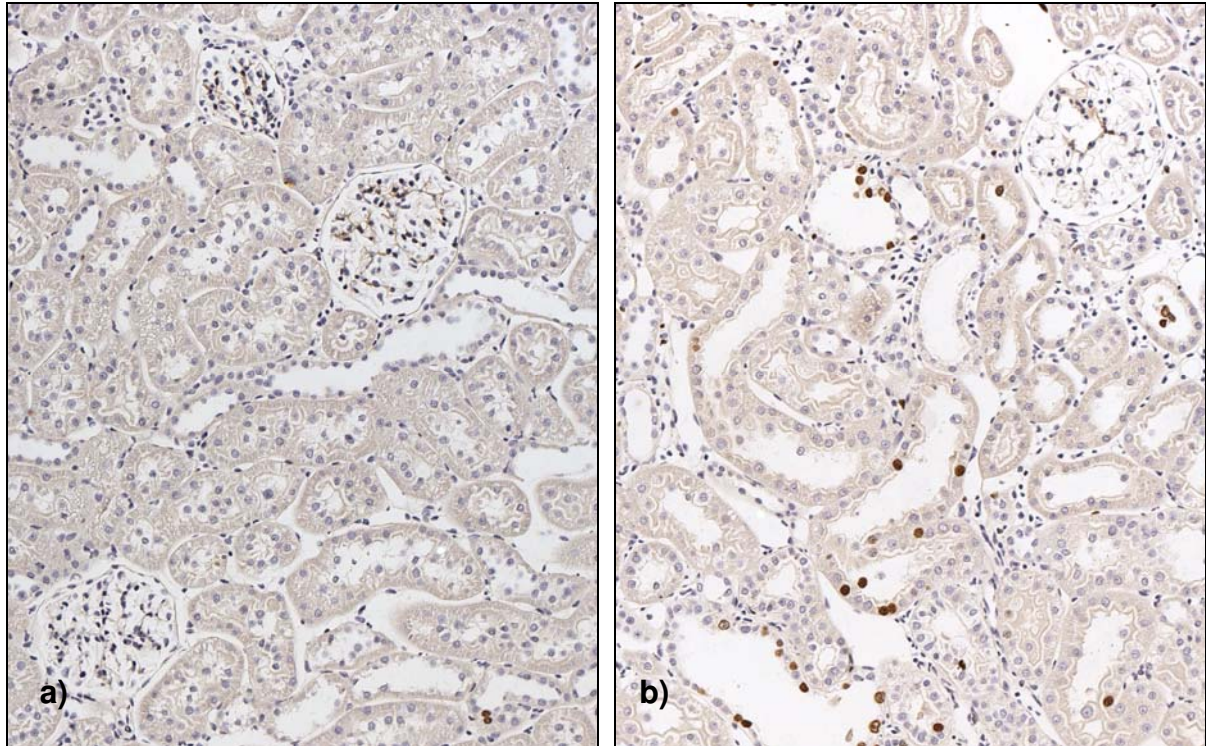
Bromdeoxyuridinmarkierte interstitielle Zellen in Nieren von Tieren mit diätetisch induzierter Hyperlipidämie(a) oder Adriamycin-Nephropathie (b)

	BrdU markierte Tubulusepithelien [Zellen/Gesichtsfeld]					BrdU markierte Tubulusepithelien [Zellen/Gesichtsfeld]			
	Fettfutter	<i>n</i>	Kontrolle	<i>n</i>		Adriamycin	<i>n</i>	Kontrolle	<i>n</i>
21 Tage	2,5 ± 0,42	8	1,8 ± 0,22	8	14 Tage	12,6 ± 3,6 *	6	1,8 ± 0,22	8
35 Tage	1,2 ± 0,20 °	7	1,6 ± 0,27	7	28 Tage	7,7 ± 1,1 *	8	1,6 ± 0,27	7

* p < 0,05 vs. Kontrolle
° p < 0,05 vs. 21 Tage derselben Diät

Tabelle 15 a, b:

Bromdeoxyuridin - markierte Tubuluszellen in Nieren von Tieren mit diätetisch induzierter Hyperlipidämie(a) oder Adriamycin-Nephropathie (b)



Tafel 4 a, b: Tubuläre proliferierende Zellen

Tubuläre Proliferation wurde durch immunhistochemischen Nachweis von 24 h vor Organentnahme injiziertem Bromdeoxyuridin gezeigt. Tiere mit Adriamycin-Nephropathie (b) zeigten gegenüber Kontrolltieren (a) eine deutlich größere Zahl Bromdeoxyuridinmarkierter Tubulusepithelzellen.

3.2.3 Reaktive Sauerstoffspezies im Tubulointerstitium und in proximalen Tubuli

Die Messung von ROS am frisch isolierten tubulointerstitiellen Gewebe zeigte mit Luminol als Detektorsubstanz (Abb. 12) bereits nach 21 Tagen Fettdiät eine signifikante Steigerung der Chemilumineszenz. Nach 35 Tagen konnte statistische Signifikanz jedoch nicht erreicht werden, wobei bemerkenswert ist, daß zu diesem Zeitpunkt auch die Kontrolltiere ein gegenüber den jüngeren Tieren gesteigertes Chemilumineszenzsignal zeigten. Für die Tiere mit Adriamycin-Nephropathie ergaben sich mit Luminol gegenüber den Kontrollen keine Unterschiede.

Lucigenin als Detektor von Superoxidanionen erbrachte nach 35 Tagen Fettdiät eine gegenüber Kontrollen signifikant gesteigerte Chemilumineszenz in tubulointerstitiellem Gewebe, während nach 21 Tagen noch keine Unterschiede gemessen werden konnten (Abbildung 13 b).

Ebenso zeigte sich bei den Tieren mit Adriamycin-Nephropathie erst vier Wochen nach Injektion eine gegenüber Kontrollen gesteigerte Chemilumineszenz.

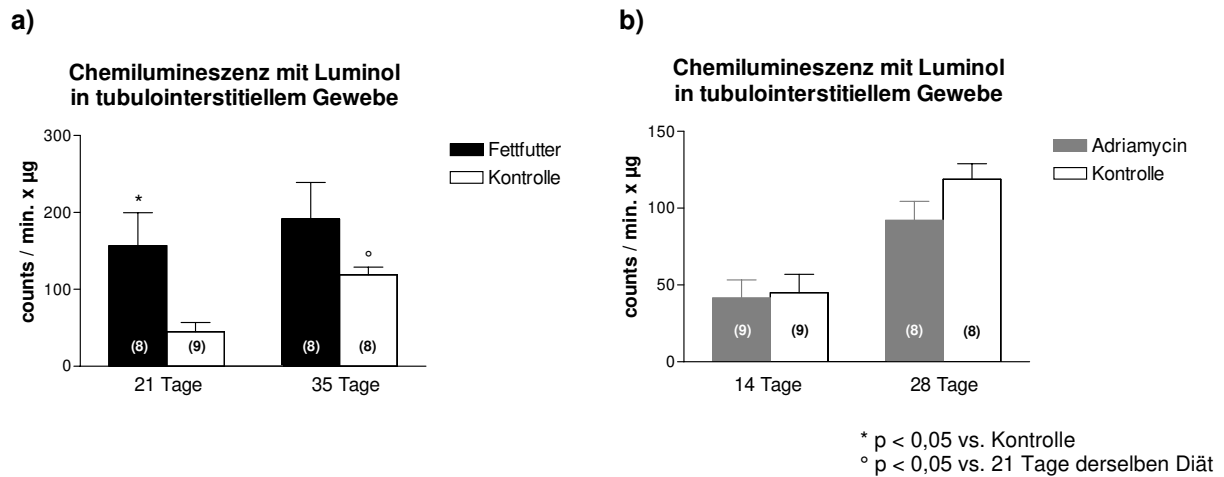


Abbildung 12 a, b:

Reaktive Sauerstoffspezies in tubulointerstitiellem Gewebe gemessen als Luminol- vermittelte Chemilumineszenz in Nieren von Tieren mit diätetisch induzierter Hyperlipidämie (a) oder Adriamycin-Nephropathie (b).

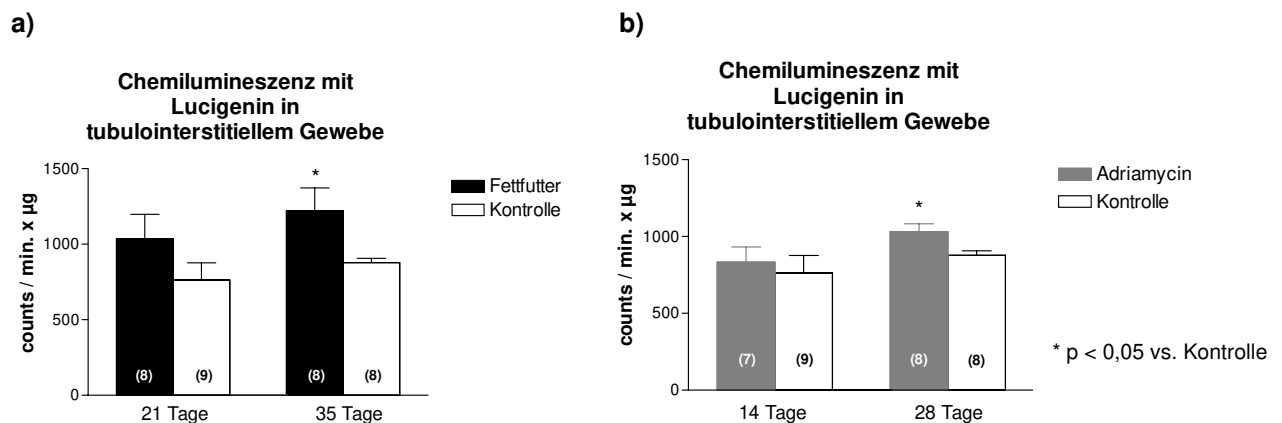


Abbildung 13 a, b:

Reaktive Sauerstoffspezies in tubulointerstitiellem Gewebe gemessen als Lucigenin- vermittelte Chemilumineszenz in Nieren von Tieren mit diätetisch induzierter Hyperlipidämie (a) oder Adriamycin-Nephropathie (b).

Zur Abschätzung, ob proximale Tubuli zur Bildung von ROS beitragen, wurden die gleichen Untersuchungen auch an frisch isolierten proximalen Tubuli durchgeführt.

Die Untersuchung mit Luminol zeigte wie schon in der nicht weiter differenzierten tubulointerstitiellen Fraktion eine signifikante Steigerung nach 21 Tagen Fettdiät, wohingegen nach 35 Tagen Fettdiät kein Unterschied zu den Kontrollen nachweisbar war (Abb.14 a).

Demgegenüber zeigten die Tiere mit Adriamycin-Nephropathie nach 28 Tagen signifikant verminderte Chemilumineszenzsignale (Abb. 14 b).

Die Messung mit Lucigenin als Detektorsubstanz zeigten keine statistisch signifikanten Veränderungen, insbesondere war auch die im Tubulointerstitium zu verzeichnende gesteigerte Chemilumineszenz nach 35 Tagen Fettdiät oder Adriamycin-Nephrose nicht nachweisbar (Abb. 15 a, b).

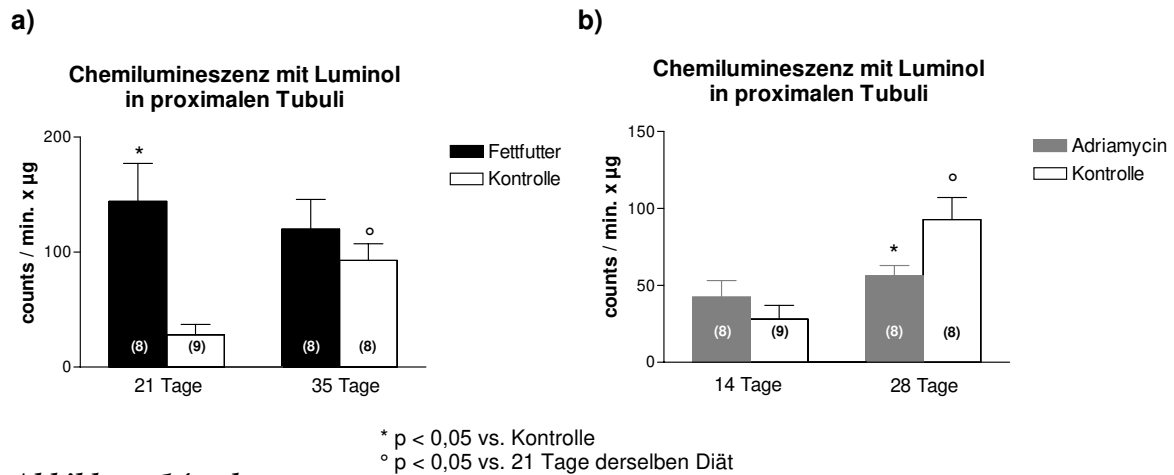


Abbildung 14 a, b:

Reaktive Sauerstoffspezies in proximalen Tubuli gemessen als Luminol-vermittelte Chemilumineszenz in Nieren von Tieren mit diätetisch induzierter Hyperlipidämie(a) oder Adriamycin-Nephropathie (b).

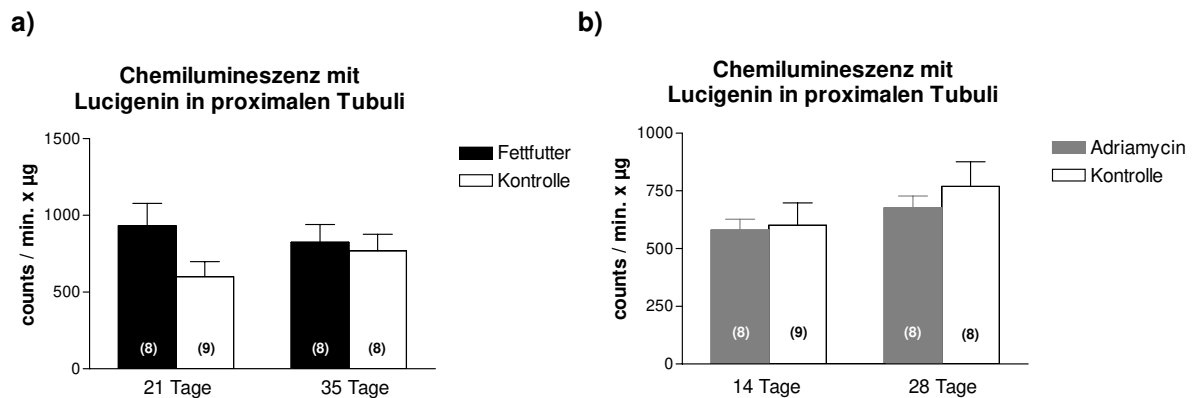


Abbildung 15 a, b:

Reaktive Sauerstoffspezies in proximalen Tubuli gemessen als Lucigenin-vermittelte Chemilumineszenz in Nieren von Tieren mit diätetisch induzierter Hyperlipidämie(a) oder Adriamycin-Nephropathie(b).

3.2.4 Wasserstoffperoxid im Tubulointerstitium und proximalen Tubuli

Die Tatsache, daß in den langfristigen Experimenten bei Hyperlipidämie eine signifikante Steigerung der Aktivität der Wasserstoffperoxid abbauenden Enzyme Catalase und Glutathionperoxidase nachweisbar war, könnte auf eine erhöhte lokale Konzentration von H_2O_2 hinweisen. Es wurde daher der Versuch unternommen, die H_2O_2 - Bildung im Gewebe nachzuweisen. Da Luminol für H_2O_2 nur eine geringe Sensitivität besitzt, wurde indirekt über das durch die Meerrettichperoxidase-Reaktion ausgelöste Chemilumineszenzsignal auf die Menge an Wasserstoffperoxid geschlossen. Die Spezifität der Messung konnte durch anschließende Zugabe von Catalase, die das Signal vollständig auslöscht, gezeigt werden. Signifikante Änderungen in der Menge an H_2O_2 fanden sich weder in der nicht weiter differenzierten tubulointerstitiellen Fraktion noch in proximalen Tubuli (Tab. 16 und 17).

	a)				b)				
	Fettfutter		Kontrolle		Adriamycin		Kontrolle		
	CL-Signal nach HRP-Zusatz im Tubulointerstitium [counts/min x µg Protein]	n	CL-Signal nach HRP-Zusatz im Tubulointerstitium [counts/min x µg Protein]	n	CL-Signal nach HRP-Zusatz im Tubulointerstitium [counts/min x µg Protein]	n	CL-Signal nach HRP-Zusatz im Tubulointerstitium [counts/min x µg Protein]	n	
21 Tage	822,2 ± 181	8	837,9 ± 195	9	14 Tage	706,5 ± 200	8	837,9 ± 195	9
35 Tage	557,7 ± 113	8	801,9 ± 91	8	28 Tage	920,8 ± 218	8	801,9 ± 91	8

Tabelle 16 a, b:

Meerrettichperoxidase (HRP) getriggerte Chemilumineszenz im Tubulointerstitium als Nachweis von Wasserstoffperoxid in Nieren von Tieren mit diätetisch induzierter Hyperlipidämie(a) oder Adriamycin-Nephropathie (b).

	a)				b)				
	Fettfutter		Kontrolle		Adriamycin		Kontrolle		
	CL-Signal nach HRP-Zusatz in proximalen Tubuli [counts/min x µg Protein]	n	CL-Signal nach HRP-Zusatz in proximalen Tubuli [counts/min x µg Protein]	n	CL-Signal nach HRP-Zusatz in proximalen Tubuli [counts/min x µg Protein]	n	CL-Signal nach HRP-Zusatz in proximalen Tubuli [counts/min x µg Protein]	n	
21 Tage	937,5 ± 305	8	848,6 ± 244	9	14 Tage	558,0 ± 159	8	848,6 ± 244	9
35 Tage	378,2 ± 65	8	466,7 ± 124	8	28 Tage	416,5 ± 99	8	466,7 ± 124	8

Tabelle 17 a, b:

Meerrettichperoxidase (HRP) getriggerte Chemilumineszenz im proximalen Tubuli als Nachweis von Wasserstoffperoxid in Nieren von Tieren mit diätetisch induzierter Hyperlipidämie(a) oder Adriamycin-Nephropathie (b).

3.2.5 Oxidative und antioxidative Enzyme im Tubulointerstitium und in proximalen Tubuli

Xanthinoxidase

Nach 35 Tagen diätetisch induzierter Hyperlipidämie war ein signifikanter Anstieg der Aktivität der Xanthinoxidase sowohl in der tubulointerstitiellen Fraktion, als auch in proximalen Tubuli zu verzeichnen. Die Behandlung der Tiere mit Wolfram über das Trinkwasser führte zu einer deutlichen Hemmung der Xanthinoxidaseaktivität an den Rand der Nachweisgrenze (Abb. 16 a und 17a). Im Modell der Adriamycin-Nephropathie kam es zu den gewählten Untersuchungszeitpunkten nicht zu einer signifikant gesteigerten Aktivität der Xanthinoxidase (Abb. 16 b und 17 b)

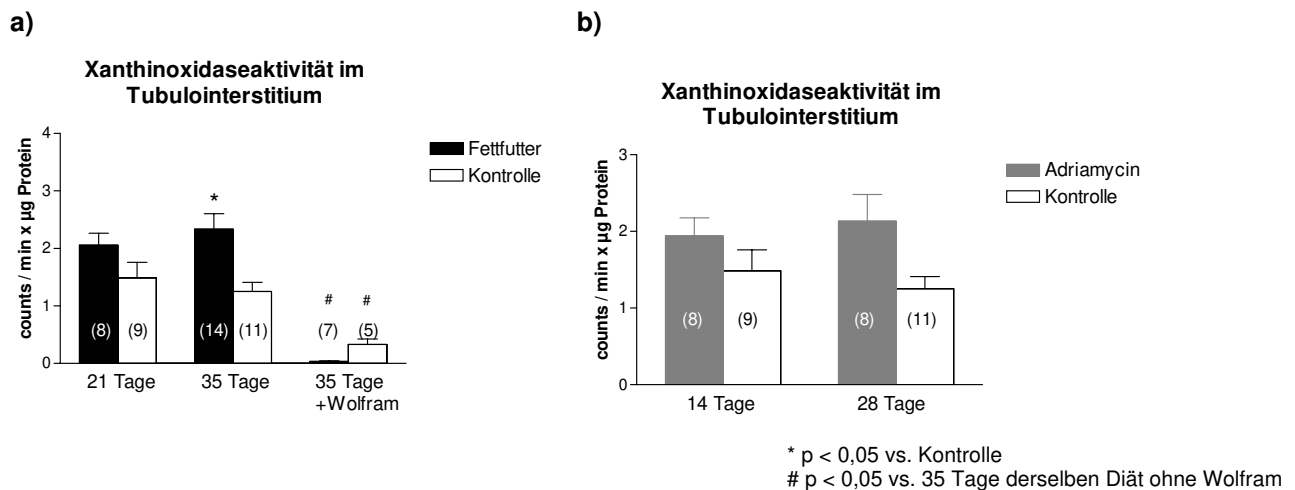


Abbildung 16 a, b:

Xanthinoxidaseaktivität im renalen Tubulointerstitium von Tieren mit diätetisch induzierter Hyperlipidämie (a) oder Adriamycin-Nephropathie (b)

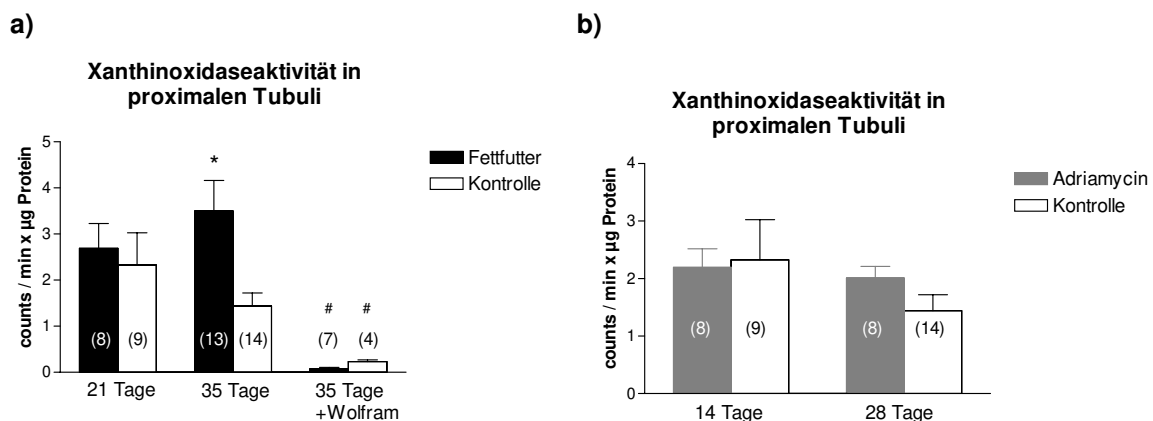


Abbildung 17 a, b:

Xanthinoxidaseaktivität in renalen proximalen Tubuli von Tieren mit diätetisch induzierter Hyperlipidämie (a) oder Adriamycin-Nephropathie (b)

NAD(P)H Oxidasen

Die Bestimmung der NADH und NADPH-Oxidasen erbrachte sowohl im Tubulointerstitium als auch in den isolierten proximalen Tubuli für das Modell der diätetisch induzierten Hyperlipidämie keinen eindeutigen Hinweis für eine Beteiligung bei der gesteigerten Entstehung von ROS. Lediglich im tubulointerstitiellen Gewebe war die Aktivität der NADPH-Oxidasen nach 21 Tagen Fettdiät gesteigert, nicht jedoch nach 35 Tagen (Abbildung 18 a).

Im Modell der Adriamycin-Nephropathie ergaben sich für die NADPH-Oxidasen keine Unterschiede zu den Kontrollen. Die Aktivität der NADH-Oxidase war 14 Tage nach Injektion in proximalen Tubuli erniedrigt (Tab. 19 b). 28 Tage nach der Injektion ergab sich keine statistische Signifikanz.

	NADH-Oxidase im Tubulointerstitium [counts/min x µg Protein]					NADH-Oxidase im Tubulointerstitium [counts/min x µg Protein]			
	Fettfutter	n	Kontrolle	n		Adriamycin	n	Kontrolle	n
21 Tage	4548 ± 224	8	4491 ± 610	9	14 Tage	3655 ± 597	8	4491 ± 610	9
35 Tage	4457 ± 334	8	3778 ± 591	8	28 Tage	4033 ± 359	8	3778 ± 591	8

Table 18 a, b:

NADH-Oxidaseaktivität gemessen in Gewebehomogenaten aus renalem Tubulointerstitium von Tieren mit diätetisch induzierter Hyperlipidämie (a) oder Adriamycin-Nephropathie (b)

	NADH-Oxidase in proximalen Tubuli [counts/min x µg Protein]					NADH-Oxidase in proximalen Tubuli [counts/min x µg Protein]			
	Fettfutter	n	Kontrolle	n		Adriamycin	n	Kontrolle	n
21 Tage	4590 ± 330	8	5729 ± 648	9	14 Tage	3668 ± 275 * 8	5729 ± 648	9	
35 Tage	4644 ± 395	8	4991 ± 866	8	28 Tage	3330 ± 344	4991 ± 866	8	

* p < 0,05 vs. Kontrolle

Table 19 a, b:

NADH-Oxidaseaktivität gemessen in Gewebehomogenaten aus renalen proximalen Tubuli von Tieren mit diätetisch induzierter Hyperlipidämie (a) oder Adriamycin-Nephropathie (b)

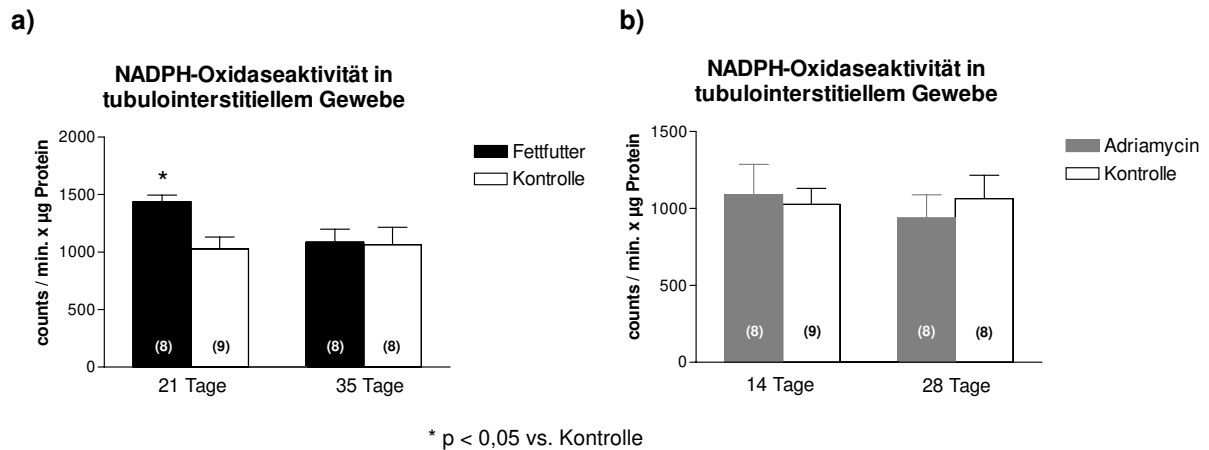


Abbildung 18 a, b:

NADPH-Oxidaseaktivität in Gewebehomogenaten aus renalem Tubulointerstitium von Tieren mit diätetisch induzierter Hyperlipidämie (a) oder Adriamycin-Nephropathie (b)

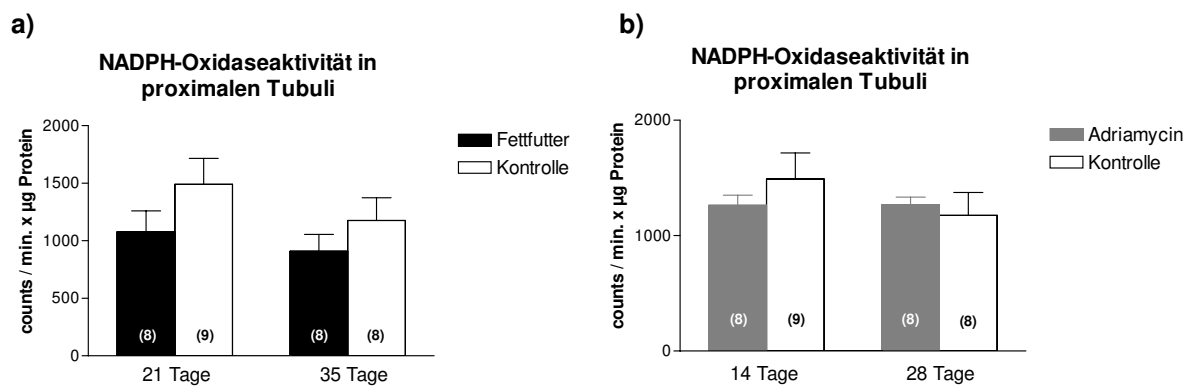


Abbildung 19 a, b:

NADPH-Oxidaseaktivität gemessen in Gewebehomogenaten aus renalen proximalen Tubuli von Tieren mit diätetisch induzierter Hyperlipidämie (a) oder Adriamycin-Nephropathie (b)

Superoxiddismutasen

Die Untersuchung der Superoxiddismutasen zeigten in den untersuchten Modellen sowohl für die gesamte Superoxiddismutase-Aktivität, wie auch für die MnSOD keine wesentlichen Veränderungen (Tab. 20 und 21). Bei schwankenden Werten in der Kontrollgruppe ergab sich lediglich eine geringe Verminderung der Gesamt SOD nach 21 Tagen Hyperlipidämie (Abb. 20 a).

In proximalen Tubuli waren die Aktivitäten für beide Isoformen zu allen Untersuchungszeitpunkten unverändert (Abb. 21).

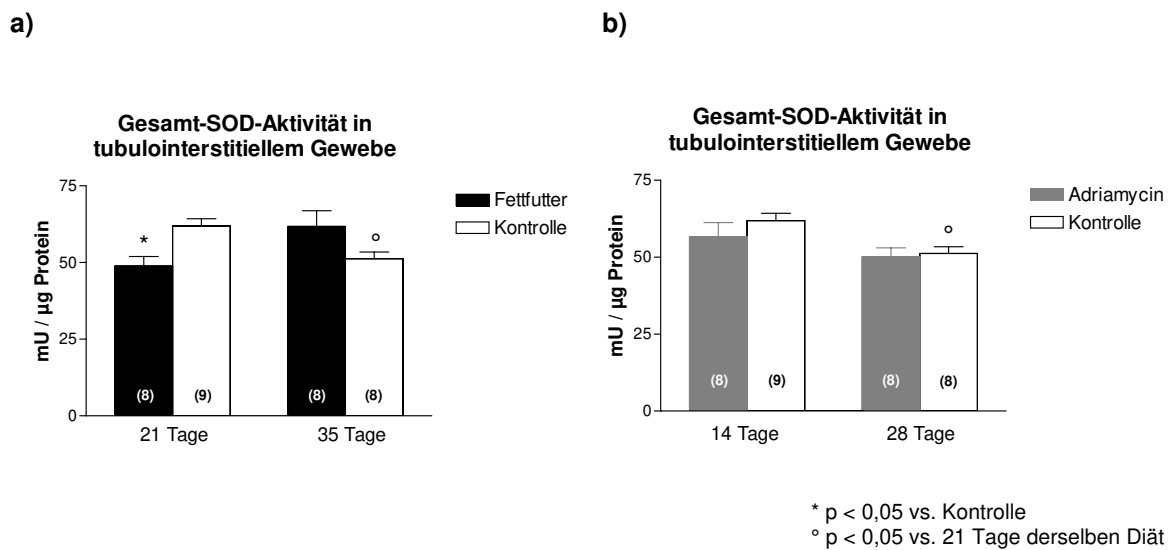


Abbildung 20 a, b:

Gesamt-SOD-Aktivität gemessen in Gewebehomogenaten aus renalem tubulointerstitiellem Gewebe von Tieren mit diätetisch induzierter Hyperlipidämie (a) oder Adriamycin-Nephropathie (b)

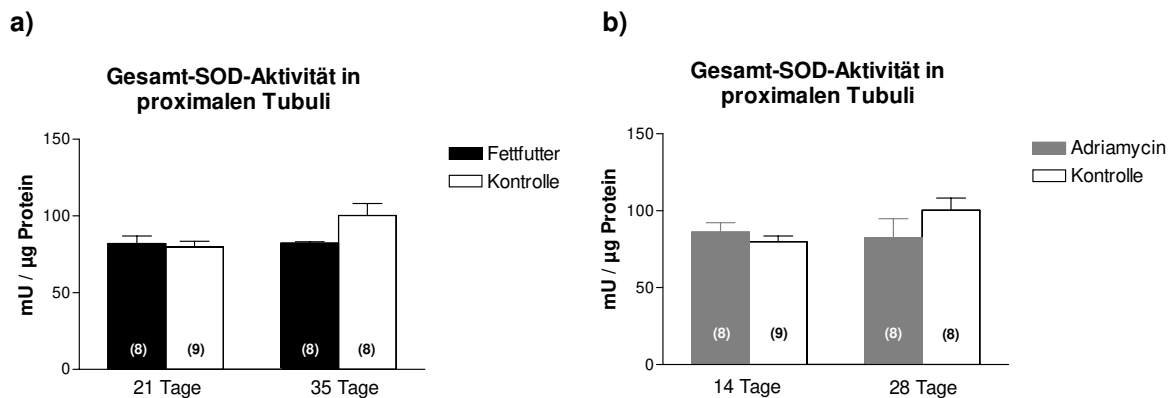


Abbildung 21 a, b:

Gesamt-SOD-Aktivität gemessen in Gewebehomogenaten aus renalen proximalen Tubuli von Tieren mit diätetisch induzierter Hyperlipidämie (a) oder Adriamycin-Nephropathie (b)

a)

	Mn SOD im Tubulointerstitium [mU / μ g Protein]			
	Fettfutter	<i>n</i>	Kontrolle	<i>n</i>
21 Tage	17,3 \pm 1,8	8	20,3 \pm 0,9	9
35 Tage	20,5 \pm 0,9	8	18,6 \pm 1,8	8

b)

	Mn SOD im Tubulointerstitium [mU / μ g Protein]			
	Adriamycin	<i>n</i>	Kontrolle	<i>n</i>
14 Tage	20,1 \pm 1,7	8	20,3 \pm 0,9	9
28 Tage	17,4 \pm 1,6	8	18,6 \pm 1,8	8

Table 20 a, b:

MnSOD-Aktivität gemessen in Gewebehomogenaten aus renalem tubulointerstitiellem Gewebe von Tieren mit diätetisch induzierter Hyperlipidämie (a) oder Adriamycin-Nephropathie (b)

a)

	Mn SOD in proximalen Tubuli [mU / μ g Protein]			
	Fettfutter	<i>n</i>	Kontrolle	<i>n</i>
21 Tage	20,4 \pm 0,5	7	21,1 \pm 1,0	9
35 Tage	22,1 \pm 0,9	8	22,8 \pm 1,9	8

b)

	Mn SOD in proximalen Tubuli [mU / μ g Protein]			
	Adriamycin	<i>n</i>	Kontrolle	<i>n</i>
14 Tage	21,0 \pm 1,7	8	21,1 \pm 1,0	9
28 Tage	20,4 \pm 1,1	8	22,8 \pm 1,9	8

Table 21 a, b:

MnSOD-Aktivität gemessen in Gewebehomogenaten aus renalen proximalen Tubuli von Tieren mit diätetisch induzierter Hyperlipidämie (a) oder Adriamycin-Nephropathie (b)

Catalase

Die Catalaseaktivität im Tubulointerstitium war bei den Tieren mit Fettdiät nach 35 Tagen signifikant gesteigert, wohingegen nach 21 Tagen noch keine Unterschiede sichtbar waren. Die Untersuchung der proximalen Tubuli zeigte hingegen keine Änderungen der Enzymaktivität. Ebenso zeigten Tiere mit Adriamycin-Nephrose keine Beeinflussung der Catalaseaktivität.

a)

	Catalaseaktivität im Tubulointerstitium [$\mu\text{Mol H}_2\text{O}_2 / \text{min} \times \text{mg Protein}$]			
	Fettfutter	<i>n</i>	Kontrolle	<i>n</i>
21 Tage	262,9 ± 16,0	8	254,9 ± 13,6	9
35 Tage	312,7 ± 29,0 *	8	235,6 ± 17,1	8

b)

	Catalaseaktivität im Tubulointerstitium [$\mu\text{Mol H}_2\text{O}_2 / \text{min} \times \text{mg Protein}$]			
	Adriamycin	<i>n</i>	Kontrolle	<i>n</i>
14 Tage	259,1 ± 18,7	8	254,9 ± 13,6	9
28 Tage	205,0 ± 23,7	8	235,6 ± 17,1	8

* p < 0,05 vs. Kontrolle

Tabelle 22 a, b:

Catalaseaktivität gemessen in Gewebehomogenaten aus renalem tubulointerstitiellem Gewebe von Tieren mit diätetisch induzierter Hyperlipidämie (a) oder Adriamycin-Nephropathie (b)

a)

	Catalaseaktivität in proximalen Tubuli [$\mu\text{Mol H}_2\text{O}_2 / \text{min} \times \text{mg Protein}$]			
	Fettfutter	<i>n</i>	Kontrolle	<i>n</i>
21 Tage	317,3 ± 17,9	8	318,2 ± 17,1	9
35 Tage	324,7 ± 25,0	8	335,9 ± 14,1	8

b)

	Catalaseaktivität in proximalen Tubuli [$\mu\text{Mol H}_2\text{O}_2 / \text{min} \times \text{mg Protein}$]			
	Adriamycin	<i>n</i>	Kontrolle	<i>n</i>
14 Tage	309,1 ± 24,6	8	318,2 ± 17,1	9
28 Tage	308,2 ± 19,5	8	335,9 ± 14,1	8

Tabelle 23 a, b:

Catalaseaktivität gemessen in Gewebehomogenaten aus renalen proximalen Tubuli Gewebe von Tieren mit diätetisch induzierter Hyperlipidämie (a) oder Adriamycin-Nephropathie (b)

Glutathionperoxidase

Im Tubulointerstitiellen Gewebe war eine erhöhte Glutathionperoxidaseaktivität nur nach 35 Tagen Fettdiät nachweisbar (Abb. 22 a). In proximalen Tubuli zeigte sich jedoch sowohl bei diätetisch induzierter Hyperlipidämie wie auch im Modell der Adriamycin-Nephropathie eine signifikante Steigerung der Aktivität der Glutathionperoxidaseaktivität zu allen Untersuchungszeitpunkten (Abb. 23 a, b).

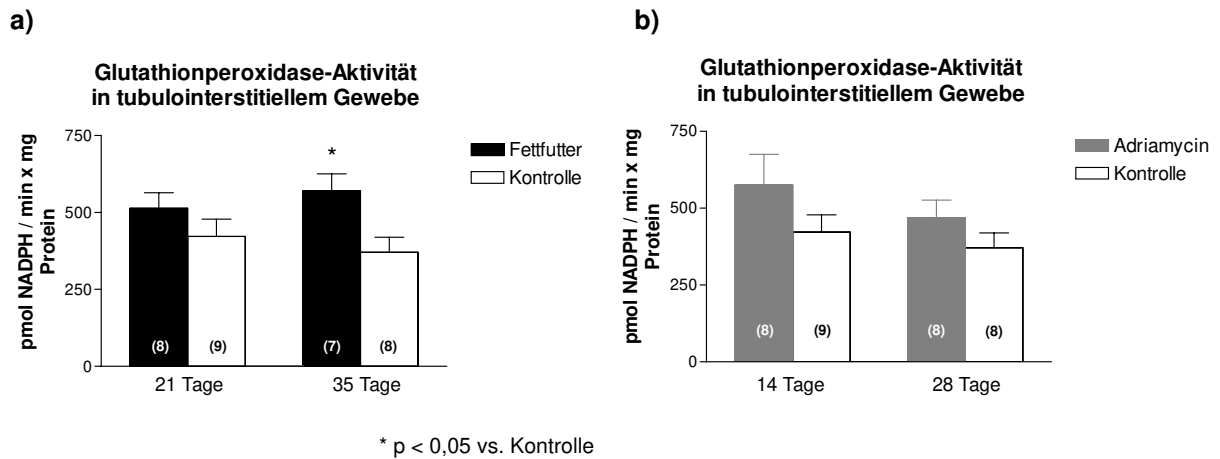


Abbildung 22 a, b:

Glutathionperoxidaseaktivität in Gewebehomogenaten aus renalem tubulointerstitiellem Gewebe von Tieren mit diätetisch induzierter Hyperlipidämie (a) oder Adriamycin-Nephropathie (b)

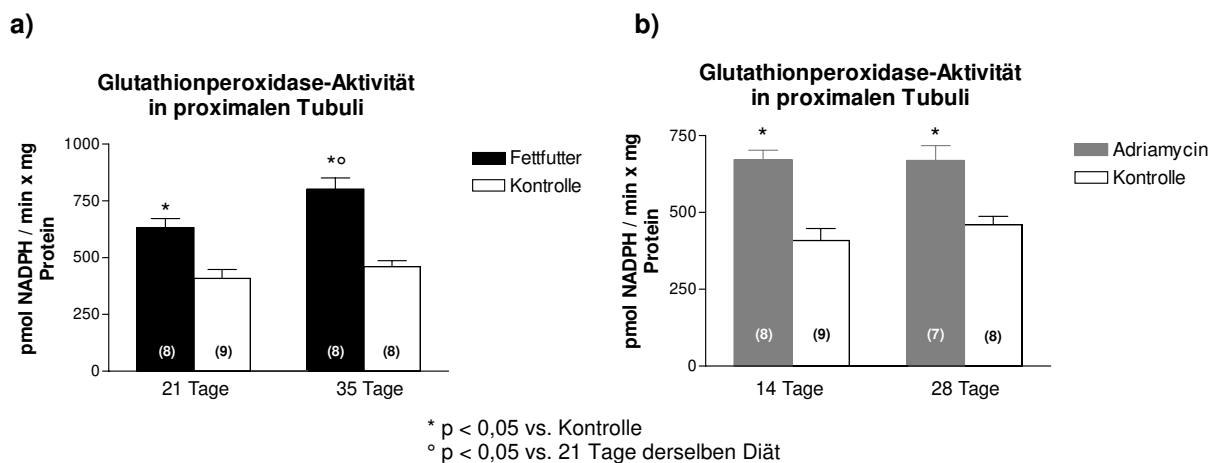


Abbildung 23 a, b:

Glutathionperoxidaseaktivität in Gewebehomogenaten aus renalen proximalen Tubuli von Tieren mit diätetisch induzierter Hyperlipidämie (a) oder Adriamycin-Nephropathie (b)

3.2.8 Zusammenfassung 2:

In diesem Teil der Arbeit konnte folgendes gezeigt werden:

- Kurzzeitige, diätetisch induzierte Hyperlipidämie führt nicht zu einer signifikanten Einschränkung der erhobenen Nierenfunktionsparameter. Im Gegensatz dazu entwickelt sich nach Adriamycinapplikation eine schwere Proteinurie und Hyperlipidämie
- sowohl diätetisch erzeugte Hypercholesterinämie, als die Adriamycin-Nephropathie führen nach innerhalb von drei Wochen zu einer tubulointerstitiellen Vermehrung von Monozyten / Makrophagen.
- Eine Hemmung der Xanthinoxidaseaktivität führt zu einer gegenüber unbehandelten Tieren deutlich verringerten interstitiellen Infiltration mit Monozyten / Makrophagen
- Im Modell der Adriamycin-Nephropathie kommt es zu einer gesteigerten Proliferation von Tubulusepithelzellen.
- Diätetisch induzierte Hypercholesterinämie führt nach 35 Tagen zu gesteigerter Bildung von ROS im Tubulointerstitium.
- Die Xanthinoxidase zeigt nach 35 Tagen Hypercholesterinämie eine deutlich gesteigerte Aktivität in proximalen Tubuli.
- Die Behandlung der Tiere mit Wolfram über das Trinkwasser vermag die Aktivität der Xanthinoxidase im Gewebe nahezu komplett zu hemmen.
- In beiden Modellen ist die Aktivität der Glutathionperoxidase in proximalen Tubuli gesteigert.

4. Diskussion

4.1 Experimente mit diätetisch induzierter Hyperlipidämie

4.1.1 Klinische Chemie und Basisparameter

Schon eine Reihe früherer experimenteller Untersuchungen konnten zeigen, daß Hyperlipidämie und insbesondere Hypercholesterinämie ohne zugrundeliegende andere Nierenerkrankung zu einer glomerulären Sklerose (Miyata und Takebayashi 1987; Gröne, Walli et al. 1994) und tubulointerstitieller Schädigung führen kann (Eddy 1996; Gröne, Hohbach et al. 1996; Ishiyama, Atarashi et al. 1999). Wie in Kapitel 1.2 dargestellt, spielen ROS zudem bei einer Reihe renaler Erkrankungen eine Rolle.

In dieser Arbeit sollte daher untersucht werden, ob ROS bei der Entstehung der renalen Veränderungen im Tiermodell bei Hyperlipidämie beteiligt sind, und welche Enzymsysteme zu dem Anstieg der ROS beitragen. Hierzu wurden Untersuchungen an Ratten mit chronischer und kurzzeitiger diätetisch induzierter Hyperlipidämie durchgeführt.

Es wurden allgemeine klinische und klinisch-chemische Parameter zur Beurteilung der Nierenfunktion zum Zeitpunkt der Organentnahme bestimmt.

Bereits nach drei Wochen Fettdiät waren die Serumcholesterinwerte gegenüber den Kontrolltieren ca. 1,5fach erhöht. Die Veränderungen im Lipoproteinprofil der Tiere unter der cholesterin- und triglyceridreichen Diät sind in früheren Arbeiten detailliert beschrieben worden (Gröne, Walli et al. 1989; Scheuer, Gwinner et al. 2000). Zusammengefaßt kommt es zu einer Steigerung des Gesamt-Cholesterins und der Triglyceride. In VLDL- und LDL-Partikeln steigt der Cholesterin - Gehalt, während der Triglyceridgehalt abnimmt. HDL-Partikel bleiben in ihrer Zusammensetzung weitgehend unverändert.

Eine Verschlechterung der Nierenfunktion, gemessen anhand des Serum-Kreatinins, ist in keinem der Experimente aufgetreten. Genauere Messungen der glomerulären Filtrationsrate wurden nicht durchgeführt. Die gemessenen Blutdruckwerte zeigten keine signifikanten Unterschiede. Dobrian et al. fanden unter diätetisch erzeugter Hypercholesterinämie bei Sprague-Dawley Ratten einzelne Tiere, bei denen Übergewicht und ein arterieller Hypertonus entstand, während andere unter derselben Diät normotensiv und nahezu normalgewichtig blieben. Diese hypertensiven Tiere zeigten dabei eine deutlich erhöhte Superoxidanionen-Generation in Aortenringen und erhöhte Lipidperoxide gemessen als TBARS (Thiobarbitursäure-reaktive Substanzen) (Dobrian, Davies et al. 2000; Dobrian, Davies et al. 2001).

Übereinstimmend mit den hier gezeigten Ergebnissen fanden die Autoren bei den Tieren mit Übergewicht und Hypertonus nach 10 Wochen Hyperlipidämie mesangiale Matrixvermehrung und fokale Sklerosen, jedoch anders als in den vorliegenden Untersuchungen keine Proteinurie. Da diese Tiere jedoch nicht uninephrektomiert waren, lief die glomeruläre Schädigung möglicherweise langsamer ab, als in den vorliegenden Experimenten, so daß eine Proteinurie eventuell zu einem späteren Zeitpunkt aufgetreten wäre. Welche Faktoren unter der gleichen Diät die Gewichtszunahme mit Hypertonus verursachen, konnten die Autoren nicht aufklären. Zum Teil starke interindividuelle Schwankungen für nahezu alle gemessenen Parameter fanden sich hingegen auch in den hier gezeigten Experimenten. Darüber hinaus müssen die Ergebnisse der Blutdruckmessung in leichter Äthernarkose wegen der möglichen Beeinflussung des Meßergebnisses durch die Narkose kritisch gesehen werden. Geringe Unterschiede zwischen den Gruppen wurden möglicherweise nicht erfaßt.

4.1.2 Histologische Untersuchungen

In den vorliegenden Untersuchungen führte diätetisch induzierte Hyperlipidämie nach 70 Tagen zu einer deutlichen Vermehrung der interstitiellen Zellzahl und zu einer beginnenden tubulointerstitiellen Schädigung und Matrixvermehrung. Bei Hyperlipidämie begleitet gesteigerte interstitielle Myofibroblasten-Aktivierung und tubulointerstitieller Schaden die Proteinurie (Joles, Kunter et al. 2000). Bekannt ist, daß tubuläre Zellen durch filtrierte, möglicherweise in Glomerula modifizierte Proteine geschädigt werden können, wie für tubuläre Epithelzellen in Kultur mit oxidierten Lipoproteinen gezeigt werden konnte (Ong und Moorhead 1994). Nach 150tägiger Hyperlipidämie konnte eine signifikant gesteigerte Expression der mRNA des profibrotischen Cytokins TGF β 1 in interstitiellen Zellen mit in situ Hybridisierung gezeigt werden (Scheuer, Gwinner et al. 2000), wobei frühere Zeitpunkte diesbezüglich nicht näher untersucht wurden. Eddy konnte jedoch bereits nach 4 Wochen Hypercholesterinämie eine gesteigerte Expression von TGF β 1 mRNA in renalem Kortex nachweisen (Eddy 1996), so daß dies möglicherweise zu der im vorliegenden chronischen Experiment vermehrten interstitiellen Fibrose beiträgt.

Eine gesteigerte tubuläre oder interstitielle Proliferation als Zeichen eines beginnenden tubulointerstitiellen Schadens fand sich im kurzzeitigen Experiment nicht. Bei den chronischen Experimenten wurde die Bromdeoxyuridin-Injektion nicht durchgeführt, so daß über Zellproliferation keine Aussage getroffen werden kann. Angesichts der sichtbaren schweren Veränderungen und der gesteigerten interstitiellen Zellzahl ist eine Zellproliferation aber zu vermuten.

Ähnlich schwerwiegende Veränderungen wie im Tubulointerstitium wurden auch in Glomerula beobachtet, in denen nach 150 Tagen diätetischer Hyperlipidämie segmentale Sklerosen nachweisbar waren. Auch in Glomerula war eine gesteigerten TGF β 1-Expression nachweisbar (Scheuer, Gwinner et al. 2000). Inwieweit diese TGF β 1-Expression durch infiltrierende Makrophagen oder durch ortständige Zellen erfolgte, konnte histologisch nicht weiter differenziert werden. Podozyten in Kultur produzieren jedoch nach Exposition mit oxidierten Lipoproteinen verstärkt TGF β und Fibronectin (Ding, van Goor et al. 1997; Roh, Kamanna et al. 1998). Sharma und Mitarbeiter konnten zeigen, daß gesteigerte TGF β Konzentrationen zu gesteigerter Albuminpermeabilität in isolierten Rattenglomerula durch Generation von Superoxid und Hydroxylradikalen führt (Sharma, Khanna et al. 2000). Zudem fanden Joles und Mitarbeiter in einem Modell der diätetisch induzierten Hyperlipidämie eine gesteigerte glomeruläre Expression von Desmin und ultrastrukturelle

Veränderungen an Podozyten, denen die Autoren bei der Entstehung der Nierenschädigung daher eine Schlüsselrolle beimessen (Joles, Kunter et al. 2000).

Möglicherweise ist also auch die Bildung von TGF β mit für die Proteinurie und Radikalgeneration verantwortlich.

Bei den Tieren mit diätetisch induzierter Hyperlipidämie zeigte sich zu den frühen Untersuchungszeitpunkten ein signifikant gesteigertes interstitielles Infiltrat mit Monozyten / Makrophagen, jedoch noch keine gesteigerte Proteinurie. Kees-Folts hatte die These aufgestellt, daß durch den tubulären Katabolismus von Albumin in proteinurischen Tieren ein proinflammatorisches chemotaktisch wirksames Lipid freigesetzt wird und diskutierte eine Abhängigkeit von den gebundenen Fettsäuren (Kees-Folts, Sadow et al. 1994). In den vorliegenden Untersuchungen trat dieses interstitielle Infiltrat aber bereits nach 3 Wochen Fettdiät auf, zu einem Zeitpunkt also, zu dem noch keine Proteinurie nachzuweisen war. Andere Faktoren müssen also eine Rolle spielen.

Eddy konnte bei hypercholesterinämischen Tieren ebenfalls eine signifikante Proteinurie nachweisen, die mit Fortdauer der Hyperlipidämie zunahm. Hiermit einher ging ein im zeitlichen Verlauf zunehmendes interstitielles Infiltrat mit Monozyten / Makrophagen. Gleichzeitig waren Adhäsionsmoleküle wie VCAM-1 und das Chemokin MCP-1 auf mRNA-Ebene hochreguliert (Eddy 1996). Eine Beobachtung, die auch in anderen Arbeiten gemacht wurde (Hattori, Nikolic-Paterson et al. 1999; Kodama N 1999).

Die große Wichtigkeit von MCP-1 für die Rekrutierung von Makrophagen konnte in hyperlipidämischen MCP-1 knockout Mäusen gezeigt werden, die in deutlich geringerem Ausmaß atherosklerotische Plaques mit monozytären Infiltraten entwickelten als Kontrolltiere (Gosling, Slaymaker et al. 1999). MCP-1 ist ein über den NF κ B-Weg geregeltes Chemokin, dem auch bei der Entstehung des monozytären Infiltrates bei diabetischer Nephropathie eine entscheidende Bedeutung zukommt (Lee FT 2004; Mezzano S 2004; Gruden G 2005), wobei bekannt ist, daß die Expression von MCP-1 durch ROS stimuliert werden kann (Satriano, Shuldiner et al. 1993). Somit kann die gemessene gesteigerte Menge von ROS im Tubulointerstitium durch eine gesteigerte Bildung von MCP-1 zu dem Infiltrat von Monozyten / Makrophagen geführt haben.

4.1.3 Reaktive Sauerstoffspezies und oxidative Enzyme bei Hyperlipidämie

Es ist seit längerem bekannt, daß proliferierende mesangiale Zellen in der Lage sind LDL zu oxidieren (Wheeler, Chana et al. 1994). Entsprechend konnte in Tieren mit experimenteller Fokal-segmentaler Glomerulosklerose und diätetisch induzierter Hyperlipidämie modifizierte LDL in Glomerula immunhistochemisch nachgewiesen werden (Diamond and Karnovsky 1988; Magil, Frohlich et al. 1993).

In Glomerula kam es nach 150 Tagen Hypercholesterinämie zu einer signifikant gesteigerten Freisetzung von ROS, wobei sowohl Messungen mit Lucigenin, als auch mit Luminol nach 150 Tagen Hypercholesterinämie eine eindeutige Steigerung zeigten. Bei der Messung mit Luminol werden auch Hydroxylradikale und andere ROS mit erfaßt (Kahl R, Weimann A et al. 1987). Angesichts der begrenzten Verfügbarkeit von Gewebe wurde auf Untersuchungen mit Hemmstoffen zur genaueren Charakterisierung der ROS verzichtet. Als möglicherweise verantwortliches Enzym konnte eine gesteigerte Aktivität der Xanthinoxidase in Glomerula nach 150 Tagen Fettdiät als auch im Tubulointerstitium beobachtet werden. Dieses Enzym scheint in Glomerula auch bei immunologisch vermittelten Nierenerkrankungen eine Rolle zu spielen, was sich aus Befunden im Modell der passiven Heymann - Nephritis und der chronischen Thy-1-Nephritis ergibt, in denen ebenfalls eine signifikant gesteigerte Aktivität der Xanthinoxidase in Glomerula gefunden werden konnte (Gwinner, Plasger et al. 1999; Scheuer, Gwinner et al. 2000).

Eddy hatte bereits nach 4 Wochen Hypercholesterinämie gesteigerte Mengen an Malondialdehyd in renalem Gewebe nachweisen können, was nahelegt, daß ROS bei der Pathogenese der tubulointerstitiellen Veränderungen schon in der Frühphase eine Rolle spielen (Eddy 1996). Entsprechend fand sich auch in den vorliegenden Untersuchungen im kurzzeitigen Modell ein gesteigertes Niveau für ROS in der Messung mit Luminol bereits nach 21 Tagen sowohl im Interstitium als auch in isolierten proximalen Tubuli. Nach 35 Tagen Fettdiät zeigte auch die Messung mit Lucigenin als Detektor vermehrt nachweisbare ROS im tubulointerstitiellen Gewebe. Dieser Befund ist jedoch möglicherweise auch durch infiltrierende Zellen mitverursacht, da er sich in den isolierten Tubuli nicht bestätigen ließ. Es konnte jedoch gezeigt werden, daß die Aktivität der Xanthinoxidase in proximalen Tubuli nach 35 Tagen Fettdiät signifikant gesteigert ist. Dieser Befund fand sich in der nicht weiter differenzierten tubulointerstitiellen Gewebefraktion ebenfalls und war auch im chronischen Experiment bei den einseitig nephrektomierten Tieren konsistent nachweisbar.

Bislang konnte eine pathophysiologische Rolle der Xanthinoxidase bei tubulointerstitiellen Nierenerkrankungen hauptsächlich für den Ischämie - Reperfusionsschaden gezeigt werden (Galat, Robinson et al. 1989; Greene und Paller 1991; Greene und Paller 1992).

In der vorliegenden Arbeit stellte sich die deutliche Steigerung der Xanthinoxidaseaktivität sowohl in Glomerula, als auch im Tubulointerstitium bei diätetisch induzierter Hyperlipidämie als einer der Hauptbefunde heraus.

Xanthinoxidase ist ein Molybdän-haltiges Enzym, das aus der Xanthindehydrogenase, der unter physiologischen Umständen überwiegenden Form, auf zwei Arten entstehen kann: entweder durch reversible Oxidation von Sulfhydrylgruppen oder aber irreversibel durch proteolytische Spaltung, wobei eines der verbleibenden Fragmente Xanthinoxidaseaktivität hat. Beide Formen katalysieren die Reaktion von molekularem Sauerstoff mit Xanthin zu Harnsäure und Superoxidanionen (Nishino, Nakanishi et al. 1997).

Daß Hypercholesterinämie in verschiedenen Organen zu einer Steigerung der Xanthinoxidase führt, zeigt sich auch daran, daß in hypercholesterinämischen Kaninchen eine zweifache Steigerung der zirkulierenden Plasmaxanthinoxidase beschrieben worden ist (White, Darley-Usmar et al. 1996). Zudem konnte Brandes in hypercholesterinämischen Kaninchen eine Steigerung der Superoxidanionengeneration in isolierten Aortenringen durch Xanthinoxidase zeigen (Brandes 1995; Brandes, Brandes et al. 2000).

Auch auf Proteinebene konnte die Aktivitätssteigerung der Xanthinoxidase mit einer Steigerung der Enzymexpression im kortikalen Homogenat korreliert werden (Scheuer, Gwinner et al. 2000), wobei das Fehlen zusätzlicher Banden im Westernblot darauf hindeutet, daß die Xanthinoxidaseaktivität nicht durch proteolytische Spaltung aus vorhandener Xanthindehydrogenase entstanden ist.

Die in den vorliegenden Experimenten gefundene gesteigerte Xanthinoxidaseaktivität kann daher zu der gemessenen gesteigerten Generation von ROS beigetragen haben.

Interessanterweise waren die Aktivitäten für NADH- und NADPH - Oxidasen, die eine wesentliche Rolle bei der Genese von ROS in Monozyten und Granulozyten spielen, generell bei älteren Tieren im chronischen Experiment vermindert, aber nicht signifikant gegenüber Kontrollen verändert.

Gerade diese Tiere zeigten jedoch die stärksten Infiltrate mit Monozyten und Makrophagen. Neale et al. haben im Modell der passiven Heymann - Nephritis, einem Modell einer membranösen Glomerulonephritis (Neale, Ullrich et al. 1993; Neale, Ojha et al. 1994) den NADH- und NADPH Oxidasen eine wesentliche Rolle bei der Entstehung von oxidativ modifizierten nichtkollagenösen Domänen im Kollagen IV der glomerulären

Basalmembranen durch Lipidperoxidation zugesprochen. Geiszt und Mitarbeiter konnten eine renale Isoform der NADPH-Oxidase ("Renox") identifizieren, die vor allem im Bereich der Pars convoluta der proximalen Tubuli, also in unmittelbarer Nähe der Stätte der Erythropoetin-Produktion lokalisiert ist. Die Autoren postulierten daher eine mögliche Funktion als Sauerstoffsensoren für das Enzym (Geiszt, Kopp et al. 2000).

Für die renale Schädigung durch Hyperlipidämie - auch im Modell einer chronischen mesangioproliferativen Glomerulonephritis (Thy1-Nephritis) - scheinen diese Enzyme jedoch keine Rolle zu spielen (Scheuer, Gwinner et al. 2000).

4.1.4 Antioxidative Enzyme bei Hyperlipidämie

Die Aktivitäten der antioxidativen Enzyme in Glomerula zeigten bei diätetisch erzeugter Hyperlipidämie im chronischen Experiment Tieren keine Veränderungen, jedoch waren bei älteren Tieren unabhängig von der Diät generell niedrigere Aktivitäten zu verzeichnen. In dieser Situation sind möglicherweise relativ geringe Steigerungen der Aktivität oxidativer Enzyme ausreichend, um in der Bilanz zu der beobachteten gesteigerter Bildung von ROS zu führen.

Im Gegensatz zu den im Tubulointerstitium weder im kurzfristigen, noch im chronischen Experiment veränderten Aktivitäten der Superoxiddismutasen war die Aktivität der Glutathionperoxidase bereits nach drei Wochen Hyperlipidämie in proximalen Tubuli gesteigert. Ein Befund, der zu den späteren Untersuchungszeitpunkten sich auch in der nicht weiter differenzierten tubulointerstitiellen Gewebefraktion wiederfand und auch im chronischen Experiment nachweisbar war.

Glutathionperoxidase ist ein cytoplasmatisches Enzym, das in nahezu allen Körperzellen vorkommt und in der Lage ist, sowohl Wasserstoffperoxid, als auch Fettsäureperoxide zu reduzieren und somit unschädlich zu machen.

Dieser Befund der gesteigerten Aktivität der Glutathionperoxidase steht im Widerspruch zu Daten von Ishiyama und Mitarbeitern, die die Aktivitäten der SOD und GPX im Nierenhomogenat unter Hypercholesterinämie signifikant vermindert fanden, wohingegen Vitamin E Supplementation die Enzymaktivitäten wieder normalisierte (Ishiyama, Atarashi et al. 1999). Die Autoren haben jedoch Homogenate aus ganzen Nierenquerschnitten, insbesondere auch mit medullärem Tubulointerstitium untersucht, während in den vorliegenden Experimenten vor der Präparation die Medulla mechanisch entfernt wurde (vergl. Kapitel 2.3.3 und 2.3.4).

Verschiedene Arbeiten demonstrierten jedoch in medullären Abschnitten insgesamt niedrigere Aktivitäten der Glutathionperoxidase als im Kortex (Scholz, Todhunter et al. 1981; Gonzalez-Flecha, Evelson et al. 1993; de Cavanagh, Fraga et al. 1997).

Muse und Mitarbeiter haben detailliert die Lokalisation der antioxidativen Enzyme in der Hamsterniere beschrieben (Muse, Oberley et al. 1994). Dabei fanden sie in gesunden Tieren eine mittlere Anfärbbarkeit für GPX des Kortex, der inneren Medulla und der Lamina cribrosa, wohingegen der innere Streifen der äußeren Medulla nur eine schwache Anfärbung zeigte. Entsprechend zeigten distale Tubuli und cortikale Sammelrohre nur Spuren einer Markierung für Glutathionperoxidase (Muse, Oberley et al. 1994).

Inwieweit sich dieses heterogene Anfärbemuster bei diätetisch induzierter Hypercholesterinämie verändert ist zur Zeit unbekannt.

Die Bildung von H_2O_2 wurde im chronischen Experiment nicht separat bestimmt, jedoch findet sich neben der gesteigerten Glutathionperoxidase ebenfalls eine gesteigerte Aktivität der Catalase nach 150 Tagen Hypercholesterinämie. Im kurzzeitigen Experiment war eine Steigerung der Catalase im Tubulointerstitium nach 35 Tagen ebenfalls zu verzeichnen. Beide Enzyme, Glutathionperoxidase und Catalase haben mit H_2O_2 zumindest teilweise das gleiche Substrat. Möglicherweise ist also die gesteigerte Catalase- und Glutathionperoxidaseaktivität als Reaktion auf einen gesteigerten Anfall von H_2O_2 bei Hyperlipidämie zu werten. Dennoch blieb der direkte Nachweis von Wasserstoffperoxid, der im kurzzeitigen Experiment angestrebt wurde (vergl. Tabelle 16 und 17), ohne richtungsweisendes Ergebnis. Die Daten zeigten jedoch enorme interindividuelle Schwankungen, so daß die Wertigkeit der Messung eingeschränkt bleibt. Dennoch nimmt H_2O_2 möglicherweise eine Schlüsselstellung ein, da es zusammen mit Chlorid das Substrat der Myeloperoxidase bildet, die zur Bildung von Hypochlorsäure (HOCl) führt (vergl. Abbildung 1).

Es ist bekannt, daß HOCl-modifizierte Lipoproteine in vitro chemotaktisch auf mononukleäre Zellen wirken und die Expression von Interleukin 8 in diesen Zellen steigern können (Woenckhaus, Kaufmann et al. 1998). Malle und Mitarbeiter konnten HOCl-modifizierte Proteine in humanem Nierengewebe bei akuter interstitieller Nephritis und in Arealen mit tubulointerstitieller Schädigung bei Nephrosklerose nachweisen (Malle, Woenckhaus et al. 1997). In Patienten mit membranöser Glomerulonephritis und membranproliferativer GN fand sich eine Kollokalisierung zwischen HOCL modifizierten Proteinen und MPO-positiven Zellen in Glomerula (Gröne, Gröne et al. 2002). Darüber hinaus konnte bei Tieren mit experimenteller mesangioproliferativer Glomerulonephritis und diätetisch erzeugter Hypercholesterinämie sowohl in kortikalem Nierengewebe als auch im Urin HOCl-modifizierte Lipoproteine nachgewiesen werden (Scheuer, Gwinner et al. 2000).

4.1.5 Bedeutung der Xanthinoxidase bei Hyperlipidämie

Basierend auf den im vorangegangenen Abschnitt beschriebenen Befunden wurde der Versuch unternommen, die Bedeutung der Xanthinoxidase in der Entstehung der interstitiellen Veränderungen in der Frühphase der Erkrankung zu klären. Hierzu wurden Tiere mit diätetisch induzierter Hyperlipidämie zusätzlich dauerhaft mit Wolfram behandelt. Diese Behandlung führt zu einem Einbau von Wolfram anstelle von Molybdän in das aktive Zentrum des Enzyms, was zu einer effektiven Hemmung der Xanthinoxidaseaktivität führt, wohingegen die Xanthindehydrogenaseaktivität unangetastet bleibt (Johnson, Waud et al. 1974). Allopurinol, als im klinischen Einsatz befindlicher Hemmstoff der Xanthinoxidase, wurde nicht eingesetzt, weil Allopurinol auch unabhängig von der Hemmung der Xanthinoxidase in der Lage ist, Sauerstoffradikale abzufangen (Peterson, Kelly et al. 1986; Ricardo, Bertram et al. 1995). Untersuchungen in in-vitro-Modellen hatten jedoch gezeigt, daß die Zugabe von Wolfram keine unmittelbare Beeinflussung des Chemilumineszenzsignals zur Folge hat. Als wesentliche Befunde fand sich eine signifikant verminderte Aktivität der Xanthinoxidase und ein deutlich vermindertes interstitielle Infiltrat mit Monozyten / Makrophagen.

Inzwischen konnte demonstriert werden, daß bei hyperlipidämischen Tieren auch die immunhistochemische Anfärbbarkeit von MCP-1 im Bereich peritubulärer Kapillaren deutlich gesteigert ist, wohingegen sie bei hyperlipidämischen Tieren mit gehemmter Xanthinoxidase deutlich geringer ausfällt (Gwinner W. 2006). Möglicherweise kommt es daher zu einer MCP-1 vermittelten Rekrutierung von Monozyten/ Makrophagen, die durch Xanthinoxidaseaktivität beeinflußt wird. Inwieweit die Hemmung der Xanthinoxidase zu transskriptionellen Unterschieden bei der Expression von proinflammatorischen Cytokinen oder Chemokinen wie z. B. MCP-1 führt, bleibt noch zu untersuchen.

4.2 Adriamycin-Nephropathie und ROS

Zur Untersuchung einer Hyperlipidämie anderer, als diätetischer Ursache, wurde ein nephrotisches Syndrom durch einmalige Injektion des Zytostatikums Adriamycin ausgelöst. Das Anthracyclin-Zytostatikum Adriamycin (syn. Doxorubicin, Adriblastin[®]) ist eine in weitem Ausmaß eingesetzte antineoplastische Substanz. Auf molekularer Ebene ist Adriamycin, besonders im Komplex mit Eisen, ein starker Hemmstoff der Protein Kinase C, einem Kernelement der Zellregulation (Hannum JA, Foglesong RJ et al. 1989).

Im Jahr 1970 haben Sternberg und Mitarbeiter bei Ratten eine starke Nephrotoxizität von Daunorubicin, einer chemisch nahe verwandten Substanz, demonstriert (Sternberg 1970). Im Jahr 1982 wurden die pathologischen Veränderungen bei der Adriamycin-Nephropathie detailliert von Bertani und Mitarbeitern beschrieben (Bertani, Poggi et al. 1982). Diese Schädigung unterliegt starken Schwankungen bei einzelnen Spezies. Nierenschädigungen sind nur für Kaninchen und Ratten beschrieben, wohingegen bei Hamstern, Affen und Menschen eine Kardiomyopathie im Vordergrund steht, die wiederum bei Ratten nicht auftritt.

Im Gegensatz zur Puromycin-aminonucleosid-Nephrose (PAN-Nephrose) kommt es trotz persistierender schwerer Proteinurie nur in einem kleinen Teil der Fälle und erst nach ca. 24 Wochen zu glomerulärer Sklerose (Okuda S 1986) bei Fortdauer der Proteinurie, so daß die Adriamycin-Nephropathie als Modell einer Minimal-Changes Glomerulopathie benutzt werden kann.

In den vorliegenden Untersuchungen trat erwartungsgemäß schon 14 Tage nach Injektion von 7 mg Adriamycin pro Kilogramm Körpergewicht eine schwere Proteinurie mit begleitender Hyperlipoproteinämie und Hypoalbuminämie als Ausdruck eines nephrotischen Syndroms auf. Die Gesamt-Cholesterin und -Triglyceridspiegel überstiegen dabei die diätetisch erreichten Werte bei weitem und es kam zu der vorbeschriebenen interstitiellen Infiltration mit Monozyten (Tamaki, Okuda et al. 1994).

Zusätzlich zeigten die Tiere mit Adriamycin-Nephropathie deutliche Zeichen der Proliferation in Tubulusepithelien.

Die ausgeprägte tubuläre und interstitielle Proliferation mag zum einen auf einer direkten Tubulotoxizität der Substanz und konsekutiver Regeneration, zum anderen auf einem direkten Effekt der Proteinurie beruhen. Adriamycin führte zu keinem Untersuchungszeitpunkt zu einer gesteigerten Generation von ROS in proximalen Tubuli und im Tubulointerstitium.

Die Xanthinoxidase wie auch die NAD(P)H-Oxidasen zeigten keine nennenswerten Aktivitätsunterschiede zu Kontrollen.

Ginevri und Mitarbeiter fanden in Ratten mit Adriamycin - Nephropathie an Tag 1 und 13 nach der Injektion jedoch eine deutlich in ihrer Aktivität gesteigerte Xanthin-Oxidase und Xanthin-Dehydrogenase (Ginevri, Gusmano et al. 1990). In Experimenten mit den Xanthinoxidase - Inhibitoren Allopurinol und Wolfram konnten die Autoren desweiteren eine signifikante Reduktion der Proteinurie feststellen.

Wenngleich die Untersuchungen in Gesamtnierenhomogenaten durchgeführt wurden - insbesondere unter Hinzunahme der medullären Anteile, die bei den hier gezeigten Untersuchungen fehlen - bleibt dennoch die Diskrepanz bestehen.

Auf Seiten der antioxidativen Enzyme blieben die Superoxiddismutasen und die Catalase in ihrer Aktivität unverändert. Lediglich die Glutathionperoxidase zeigte zu beiden Untersuchungszeitpunkten eine signifikant gesteigerte Aktivität.

Veränderungen des oxidativ / antioxidativen Gleichgewichts scheinen daher auch im Modell der Adriamycin-Nephropathie eine Rolle zu spielen.

In dem ebenfalls gebräuchlichen Modell eines nephrotischen Syndroms, der Puromycin-Aminonukleosid - Nephrose fanden Drukker und Eddy keinen positiven Effekt zur Verhinderung der interstitiellen Veränderungen durch das antioxidativ wirkende Probucol, wie auch durch den Lipidsenker Lovastatin (Drukker and Eddy 1998).

In der Kombination aus diätetische induzierter Hypercholesterinämie und Puromycin-Aminonukleosid -Nephrose konnte jedoch eine antioxidative Therapie mit Probucol oder Vitamin E die Menge an kortikalem Malondialdehyd und oxLDL signifikant reduzieren. In diesem Experiment zeigte die diätetische Hypercholesterinämie einen additiven Effekt (Lee, Jeong et al. 1997). Offenbar scheint eine Hyperlipidämie im nephrotischen Syndrom andere Auswirkungen zu haben, als eine diätetisch induzierte.

Die Kernfrage bleibt jedoch, warum die massiven Lipoproteinveränderungen im nephrotischen Syndrom nicht selbst auch zu einer gesteigerten Bildung von ROS und erhöhten Aktivität der Xanthinoxidase führen, wie das eine diätetisch induzierte Hyperlipoproteinämie tut.

Das nephrotische Syndrom der Ratte unterscheidet sich von dem des Menschen dahingehend, daß in der nephrotischen Ratte HDL-Spiegel erhöht sind, wohingegen sie beim Menschen entweder unverändert oder erniedrigt sind. In der Ratte findet sich das meiste Cholesterin

jedoch sowieso im HDL, wohingegen beim Menschen LDL der Hauptcholesterinträger ist (Kaysen 1991; Kaysen und de Sain-van der Velden 1999).

Obwohl es eine Reihe von Arbeiten gibt, die zeigen, daß Lipid - Abnormalitäten zu glomerulärem Schaden beitragen können, gibt es dennoch Modelle für Hyperlipidämie, die keine Nierenschädigung entwickeln. So findet man im hyperlipidämischen Watanabe - Kaninchen zwar einen defekten LDL-Rezeptor und konsekutiv massive Hypercholesterinämie sowie atherosklerotische Veränderungen, jedoch keine Nierenschädigung. Demgegenüber findet man bei Kaninchen, die mit einer cholesterinangereicherten Diät gefüttert wurden, glomeruläre Veränderungen und Atherosklerose (Keane, Mulcahy et al. 1991).

Bei allen Tieren, die glomeruläre Schädigungen entwickelten fanden sich gesteigerte Mengen an VLDL, wohingegen Atherosklerose lediglich mit erhöhten LDL-Spiegeln assoziiert zu sein scheint (Keane, Mulcahy et al. 1991). LDL -Partikel, nicht jedoch VLDL können die Wand der Arteriolen penetrieren (Nordestgaard and Zilvermit 1989).

Es besteht daher die Theorie, daß die Nierenschädigung durch große Partikel wie eben VLDL induziert wird, die quasi im Mesangium "hängenbleiben", da auch eine Reihe anderer großer Moleküle wie z.B. aggregierte Immunglobuline sich im Mesangium ablagern (Keane, Mulcahy et al. 1991).

Auch diese Theorie vermag jedoch das Problem nicht zu erklären, da in Ratten mit experimentell induziertem nephrotischem Syndrom der Abbau von Chylomikronen und VLDL stark beeinträchtigt ist (Kaysen 1991; Kaysen and de Sain-van der Velden 1999).

Offenbar spielt also die Art der Hyperlipidämie eine entscheidende Rolle für die Auswirkungen auf die Niere. Welche Lipidveränderungen dafür verantwortlich sind, konnte bislang nicht abschließend geklärt werden.

5. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden Veränderungen des oxidativ / antioxidativen Gleichgewichts in verschiedenen Tiermodellen einer Hyperlipidämie untersucht. Dabei wurde versucht, eine Verbindung zwischen den vorbeschriebenen histopathologischen Veränderungen und dem Nachweis von reaktiven Sauerstoffspezies, sowie den beteiligten Enzymsystemen herzustellen.

Es konnte gezeigt werden, daß in Modellen einer diätetisch induzierten Hyperlipidämie eine gesteigerte Freisetzung von ROS vorkommt. Als wahrscheinlich wesentlich beteiligtes Enzym stellte sich die Xanthinoxidase heraus, die auch schon zu frühen Untersuchungszeitpunkten signifikant in ihrer Aktivität gesteigert war. NADH- und NADPH - Oxidasen spielen in den untersuchten Modellen wahrscheinlich keine Rolle.

Die angestrebte Verbindung mit histopathologischen Veränderungen konnte anhand des interstitiellen Infiltrates von Monozyten und Makrophagen erbracht werden, das in Tieren mit gehemmter Aktivität der Xanthinoxidase signifikant vermindert war. Inwieweit der bei langfristiger Hyperlipidämie entstehende tubulointerstitielle Schaden und die glomerulären Veränderungen unter gehemmter Xanthinoxidase zu verhindern gewesen wären konnte nicht geklärt werden. Dennoch scheint das Enzym bei der Rekrutierung der infiltrierenden Zellen eine Schlüsselrolle zu spielen.

Ferner konnte gezeigt werden, daß auf Seiten der antioxidativen Enzyme die Aktivität der Glutathionperoxidase und der Catalase gesteigert sind. Inwieweit dies als zellulärer Abwehrmechanismus auf vermehrtes Auftreten von H_2O_2 zu verstehen ist bleibt unklar. Der direkte Nachweis von vermehrtem Wasserstoffperoxid in Geweben von Tieren mit diätetisch induzierter Hyperlipidämie gelang nicht.

Bei Tieren mit Adriamycin-Nephropathie, einem Modell eines schweren nephrotischen Syndroms konnte eine vermehrtes Auftreten von ROS nicht nachgewiesen werden. Die untersuchten oxidativen und antioxidativen Enzyme waren im Wesentlichen unverändert. Lediglich eine gesteigerte Glutathionperoxidaseaktivität in proximalen Tubuli konnte nachgewiesen werden. Parallel dazu fand sich eine deutlich gesteigerte Proliferation von Tubulusepithelien. Möglicherweise handelt es sich daher bei der Steigerung der Aktivität der Glutathionperoxidaseaktivität um eine unspezifische Antwort auf eine Schädigung tubulärer Zellen.

Die Pathomechanismen bei diätetisch induzierter Hyperlipidämie und einem nephrotischen Syndrom scheinen daher unterschiedlich zu sein.

6. Literatur

- Aebi, H. (1982). Catalase, Verlag Chemie, Germany.
- Agapito, M. T., Y. Antolin, et al. (2001). "Protective effect of melatonin against adriamycin toxicity in the rat." J Pineal Res **31**(1): 23-30.
- Bertani, T., A. Poggi, et al. (1982). "Adriamycin-induced nephrotic syndrome in rats: sequence of pathologic events." Lab Invest **46**(1): 16-23.
- Beutler, E. (1975). Glutathione peroxidase (GSH-Px). Red Cell Metabolism: A Manual of Biochemical Methods. E. Beutler. New York, Grune and Stratton: 71 - 73.
- Brandes, R. P. (1995). "- Vaskuläre Superoxidanionenproduktion - In-vitro-Untersuchungen in der lucigeninverstärkten Chemilumineszenz." Dissertationsschrift.
- Brandes, R. P., S. Brandes, et al. (2000). "L-arginine supplementation in hypercholesterolemic rabbits normalizes leukocyte adhesion to non-endothelial matrix." Life Sci **66**(16): 1519-24.
- Bray, R. C., S. A. Cockle, et al. (1974). "Reduction and inactivation of superoxide dismutase by hydrogen peroxide." Biochem J **139**(1): 43-8.
- Brown, M. S. and J. L. Goldstein (1990). "Atherosclerosis. Scavenging for receptors." Nature **343**(6258): 508-9.
- Chanock SJ, E. B. J., Smith RM, Babior BM (1994). "The Respiratory Burst Oxidase." The Journal of Biological Chemistry **269**(40): 24519-24522.
- Cheeseman K.H., S. T. F. (1993). "An Introduction to free radical biochemistry." British Medical Bulletin **49**(3): 481-493.
- Crapo, J., J. McCord, et al. (1978). Preparation and assay of superoxide dismutases. Methods in Enzymology. S. Fleischer and L. Packer. New York, Academic. **53**: 382 - 393.
- de Cavanagh, E. M., C. G. Fraga, et al. (1997). "Enalapril and captopril enhance antioxidant defenses in mouse tissues." Am J Physiol **272**(2 Pt 2): R514-8.
- Diamond, J. R. and M. J. Karnovsky (1988). "Focal and segmental glomerulosclerosis: analogies to atherosclerosis." Kidney Int **33**(5): 917-24.
- Ding, G., H. van Goor, et al. (1997). "Oxidized LDL stimulates the expression of TGF-beta and fibronectin in human glomerular epithelial cells." Kidney Int **51**(1): 147-54.
- Dobrian, A. D., M. J. Davies, et al. (2000). "Development of hypertension in a rat model of diet-induced obesity." Hypertension **35**(4): 1009-15.
- Dobrian, A. D., M. J. Davies, et al. (2001). "Oxidative stress in a rat model of obesity-induced hypertension." Hypertension **37**(2 Part 2): 554-60.

- Drukker, A. and A. A. Eddy (1998). "Failure of antioxidant therapy to attenuate interstitial disease in rats with reversible nephrotic syndrome." J Am Soc Nephrol **9**(2): 243-51.
- Eddy, A. A. (1996). "Interstitial inflammation and fibrosis in rats with diet-induced hypercholesterolemia." Kidney Int **50**(4): 1139-49.
- Fauci, B., Isselbacher, Wilson, Martin, Kasper, Hauser, Longo (1998). Harrison's Principles of Internal Medicine, McGraw-Hill.
- Fligiel, S. E., E. C. Lee, et al. (1984). "Protein degradation following treatment with hydrogen peroxide." Am J Pathol **115**(3): 418-25.
- French, S. W., W. Yamanaka, et al. (1967). "Dietary induced glomerulosclerosis in the guinea pig." Arch Pathol **83**(2): 204-10.
- Gaertner S, F. J., Janssen U (1997). "Glomerular oxidative and antioxidative activity in experimental mesangioproliferative glomerulonephritis (abstract)." J Am Soc Nephrol **8**: 472A - 473A.
- Galat, J. A., A. V. Robinson, et al. (1989). "Oxygen free radical mediated renal dysfunction." J Surg Res **46**(5): 520-5.
- Geiszt, M., J. B. Kopp, et al. (2000). "Identification of renox, an NAD(P)H oxidase in kidney." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(14): 8010-4.
- Ginevri, F., R. Gusmano, et al. (1990). "Renal purine efflux and xanthine oxidase activity during experimental nephrosis in rats: difference between puromycin aminonucleoside and adriamycin nephrosis." Clin Sci (Lond) **78**(3): 283-93.
- Gjone, E., J. P. Blomhoff, et al. (1974). "Possible association between an abnormal low density lipoprotein and nephropathy in lecithin: cholesterol acyltransferase deficiency." Clin Chim Acta **54**(1): 11-8.
- Gonzalez-Flecha, B., P. Evelson, et al. (1993). "Hydrogen peroxide metabolism and oxidative stress in cortical, medullary and papillary zones of rat kidney." Biochim Biophys Acta **1157**(2): 155-61.
- Gosling, J., S. Slaymaker, et al. (1999). "MCP-1 deficiency reduces susceptibility to atherosclerosis in mice that overexpress human apolipoprotein B." J Clin Invest **103**(6): 773-8.
- Greene, E. L. and M. S. Paller (1991). "Oxygen free radicals in acute renal failure." Miner Electrolyte Metab **17**(2): 124-32.
- Greene, E. L. and M. S. Paller (1992). "Xanthine oxidase produces O₂⁻ in posthypoxic injury of renal epithelial cells." Am J Physiol **263**(2 Pt 2): F251-5.

- Griendling, K. K., C. A. Minieri, et al. (1994). "Angiotensin II stimulates NADH and NADPH oxidase activity in cultured vascular smooth muscle cells." Circ Res **74**(6): 1141-8.
- Gröne, E. F., H. E. Abboud, et al. (1992). "Actions of lipoproteins in cultured human mesangial cells: modulation by mitogenic vasoconstrictors." Am J Physiol **263**(4 Pt 2): F686-96.
- Gröne, E. F., A. K. Walli, et al. (1994). "The role of lipids in nephrosclerosis and glomerulosclerosis." Atherosclerosis **107**(1): 1-13.
- Gröne, H. and H. U. (1986). "Impairment and recovery of the clipped kidney in two kidney, one clip hypertensive rats during and after antihypertensive therapy." Lab Invest **54**(6): 645-55.
- Gröne, H. J., E. F. Grone, et al. (2002). "Immunohistochemical detection of hypochlorite-modified proteins in glomeruli of human membranous glomerulonephritis." Lab Invest **82**(1): 5-14.
- Gröne, H. J., J. Hohbach, et al. (1996). "Modulation of glomerular sclerosis and interstitial fibrosis by native and modified lipoproteins." Kidney Int Suppl **54**: S18-22.
- Gröne, H. J., A. Walli, et al. (1989). "Induction of glomerulosclerosis by dietary lipids. A functional and morphologic study in the rat." Lab Invest **60**(3): 433-46.
- Gröne, H. J., A. K. Walli, et al. (1990). "Receptor mediated uptake of apo B and apo E rich lipoproteins by human glomerular epithelial cells." Kidney Int **37**(6): 1449-59.
- Gröne, H. J., A. K. Walli, et al. (1993). "Arterial hypertension and hyperlipidemia as determinants of glomerulosclerosis." Clin Investig **71**(10): 834-9.
- Gruden G, S. G., Hayward A, Sugden D, Duggan S, Burt D, Buckingham RE, Gnudi L, Viberti G. (2005). "Mechanical Stretch Induces Monocyte Chemoattractant Activity via an NF- κ B-Dependent Monocyte Chemoattractant Protein-1-Mediated Pathway in Human Mesangial Cells: Inhibition by Rosiglitazone." Am Soc Nephrol. **Jan 26**; [Epub ahead of print].
- Gupta, S., V. Rifichi, et al. (1992). "Interactions of LDL and modified LDL with mesangial cells and matrix." Kidney Int **41**(5): 1161-9.
- Gwinner, W., U. Deters-Evers, et al. (1998). "Antioxidant-oxidant balance in the glomerulus and proximal tubule of the rat kidney." J Physiol **509**(Pt 2): 599-606.
- Gwinner, W., Gröne, H.-J. (2000). "Role of reactive oxygen species in glomerulonephritis." Nephrol Dial Transplant **15**: 1127 - 1132.

- Gwinner, W., U. Landmesser, et al. (1997). "Reactive oxygen species and antioxidant defense in puromycin aminonucleoside glomerulopathy." J Am Soc Nephrol **8**(11): 1722-31.
- Gwinner, W., J. Plasger, et al. (1999). "Role of xanthine oxidase in passive Heymann nephritis in rats." J Am Soc Nephrol **10**(3): 538-44.
- Gwinner W., S. H., Haller H., Brandes RP., Groene H-J. (2006). "Pivotal role of xanthine oxidase in the initiation of tubulointerstitial renal injury in rats with hyperlipidemia." Kidney Int. **69**: 481 - 487.
- Gyllenhammar, H. (1987). "Lucigenin chemiluminescence in the assessment of neutrophil superoxide production." J Immunol Methods **97**(2): 209-13.
- Hannum JA, Foglesong RJ, et al. (1989). "The adriamycin-iron (III) complex is a potent inhibitor of protein kinase C." J Biol Chem **264**: 9960-9966.
- Hattori, M., D. J. Nikolic-Paterson, et al. (1999). "Mechanisms of glomerular macrophage infiltration in lipid-induced renal injury." Kidney Int Suppl **71**: S47-50.
- Hazell, L. J., L. Arnold, et al. (1996). "Presence of hypochlorite-modified proteins in human atherosclerotic lesions." J Clin Invest **97**(6): 1535-44.
- Helmchen, U., B. RM, et al. (1984). "Intrarenal arteries in rats with early two-kidney, one clip hypertension." Hypertension **6**(6 Pt 2): III87-92.
- Ichikawa, I., S. Kiyama, et al. (1994). "Renal antioxidant enzymes: their regulation and function." Kidney Int **45**(1): 1-9.
- Imlay, J. A., S. M. Chin, et al. (1988). "Toxic DNA damage by hydrogen peroxide through the Fenton reaction in vivo and in vitro." Science **240**(4852): 640-2.
- Ishiyama, A., K. Atarashi, et al. (1999). "Role of free radicals in the pathogenesis of lipid-induced glomerulosclerosis in rats." Kidney Int **55**(4): 1348-58.
- Janssen, Y. M., B. Van Houten, et al. (1993). "Cell and tissue responses to oxidative damage." Lab Invest **69**(3): 261-74.
- Johnson, J. L., W. R. Waud, et al. (1974). "Molecular basis of the biological function of molybdenum. Molybdenum- free xanthine oxidase from livers of tungsten-treated rats." J Biol Chem **249**(16): 5056-61.
- Joles, J. A., U. Kunter, et al. (2000). "Early mechanisms of renal injury in hypercholesterolemic or hypertriglyceridemic rats." J Am Soc Nephrol **11**(4): 669-83.
- Kahl R, Weimann A, et al. (1987). "Detection of oxygen activation and determination of the activity of antioxidants towards reactive oxygen species by use of the chemiluminogenic probes luminol and lucigenin." Arch Toxicol **60**: 158-162.
- Kaysen, G. A. (1991). "Hyperlipidemia of the nephrotic syndrome."

- Kidney Int Suppl **31**: S8-15.
- Kaysen, G. A. and M. G. de Sain-van der Velden (1999). "New insights into lipid metabolism in the nephrotic syndrome." Kidney Int Suppl **71**: S18-21.
- Keane, W. F., B. L. Kasiske, et al. (1988). "Hyperlipidemia and the progression of renal disease." Am J Clin Nutr **47**(1): 157-60.
- Keane, W. F., W. S. Mulcahy, et al. (1991). "Hyperlipidemia and progressive renal disease." Kidney Int Suppl **31**: S41-8.
- Kees-Folts, D., J. L. Sadow, et al. (1994). "Tubular catabolism of albumin is associated with the release of an inflammatory lipid." Kidney Int **45**(6): 1697-709.
- Kodama N, O. H., Yamada Y et al. (1999). "Involvement of MCP-1 and M-CSF in glomerular foam cell formation in ExHC rats." Kidney Int **56**(Suppl. 71): S174-S177.
- Lander, H. M. (1997). "An essential role for free radicals and derived species in signal transduction." Faseb J **11**(2): 118-24.
- Lee FT, C. Z., Long DM, Panagiotopoulos S, Jerums G, Cooper ME, Forbes JM. (2004). "Interactions between angiotensin II and NF-kappaB-dependent pathways in modulating macrophage infiltration in experimental diabetic nephropathy." J Am Soc Nephrol. **15**(8): 2139-51.
- Lee, H. S., J. Y. Jeong, et al. (1997). "Dietary antioxidant inhibits lipoprotein oxidation and renal injury in experimental focal segmental glomerulosclerosis." Kidney Int **51**(4): 1151-9.
- Li, Y., H. Zhu, et al. (1998). "Validation of lucigenin (bis-N-methylacridinium) as a chemilumigenic probe for detecting superoxide anion radical production by enzymatic and cellular systems." J Biol Chem **273**(4): 2015-23.
- Lowry, O., N. Rosebrough, et al. (1951). "Protein measurement with the Folin phenol reagent." J. Biol. Chem. **193**: 265 - 275.
- Magil, A. B., J. J. Frohlich, et al. (1993). "Oxidized low-density lipoprotein in experimental focal glomerulosclerosis." Kidney Int **43**(6): 1243-50.
- Malle, E., L. Hazell, et al. (1995). "Immunologic detection and measurement of hypochlorite-modified LDL with specific monoclonal antibodies." Arterioscler Thromb Vasc Biol **15**(7): 982-9.
- Malle, E., C. Woenckhaus, et al. (1997). "Immunological evidence for hypochlorite-modified proteins in human kidney." Am J Pathol **150**(2): 603-15.

- Mezzano S, A. C., Droguett A, Burgos ME, Ardiles L, Flores C, Schneider H, Ruiz-Ortega M, Egido J. (2004). "NF-kappaB activation and overexpression of regulated genes in human diabetic nephropathy." Nephrol Dial Transplant. **19**(10): 2505-12.
- Miyata, J. and S. Takebayashi (1987). "Effect of hyperlipidemia on glomerular sclerosis in unilateral nephrectomized rats." Acta Pathol Jpn **37**(9): 1433-9.
- Mohazzab, K. M. and M. S. Wolin (1994). "Sites of superoxide anion production detected by lucigenin in calf pulmonary artery smooth muscle." Am J Physiol **267**(6 Pt 1): L815-22.
- Montilla, P., I. Tunez, et al. (2000). "Hyperlipidemic nephropathy induced by adriamycin in ovariectomized rats: role of free radicals and effect of 17-beta-estradiol administration." Nephron **85**(1): 65-70.
- Moorhead, J. F., M. K. Chan, et al. (1982). "Lipid nephrotoxicity in chronic progressive glomerular and tubulo- interstitial disease." Lancet **2**(8311): 1309-11.
- Munk, F. (1913). "Klinische Diagnostik der degenerativen Nierenerkrankungen." Z Clin Med **78**: 1 - 52.
- Muse, K. E., T. D. Oberley, et al. (1994). "Immunolocalization of antioxidant enzymes in adult hamster kidney." Histochem J **26**(9): 734-53.
- Neale, T. J., P. P. Ojha, et al. (1994). "Proteinuria in passive Heymann nephritis is associated with lipid peroxidation and formation of adducts on type IV collagen." J Clin Invest **94**(4): 1577-84.
- Neale, T. J., R. Ullrich, et al. (1993). "Reactive oxygen species and neutrophil respiratory burst cytochrome b558 are produced by kidney glomerular cells in passive Heymann nephritis." Proc Natl Acad Sci U S A **90**(8): 3645-9.
- Nishino, T., S. Nakanishi, et al. (1997). "Conversion of xanthine dehydrogenase into oxidase and its role in reperfusion injury." Biochem Soc Trans **25**(3): 783-6.
- Nordestgaard, B. G. and D. B. Zilversmit (1989). "Comparison of arterial intimal clearances of LDL from diabetic and nondiabetic cholesterol-fed rabbits. Differences in intimal clearance explained by size differences." Arteriosclerosis **9**(2): 176-83.
- Okuda S, O. Y. e. a. (1986). "Adriamycin-induced nephropathy as a model of chronic progressive glomerular disease." Kidney Int **29**: 502 - 510.
- Ong, A. C. and J. F. Moorhead (1994). "Tubular lipidosi: epiphenomenon or pathogenetic lesion in human renal disease?" Kidney Int **45**(3): 753-62.
- Peterson, D. A., B. Kelly, et al. (1986). "Allopurinol can act as an electron transfer agent. Is this relevant during reperfusion injury?" Biochem Biophys Res Commun **137**(1): 76-9.

- Prasad, K. and J. Kalra (1989). "Experimental atherosclerosis and oxygen free radicals." Angiology **40**(9): 835-43.
- Ricardo, S. D., J. F. Bertram, et al. (1995). "Podocyte architecture in puromycin aminonucleoside-treated rats administered tungsten or allopurinol." Exp Nephrol **3**(5): 270-9.
- Roh, D. D., V. S. Kamanna, et al. (1998). "Oxidative modification of low-density lipoprotein enhances mesangial cell protein synthesis and gene expression of extracellular matrix proteins." Am J Nephrol **18**(4): 344-50.
- Romeis, B. (1992). Mikroskopische Technik, Urban und Schwarzenberg.
- Satriano, J. A., M. Shuldiner, et al. (1993). "Oxygen radicals as second messengers for expression of the monocyte chemoattractant protein, JE/MCP-1, and the monocyte colony-stimulating factor, CSF-1, in response to tumor necrosis factor-alpha and immunoglobulin G. Evidence for involvement of reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH)-dependent oxidase." J Clin Invest **92**(3): 1564-71.
- Scheuer, H., W. Gwinner, et al. (2000). "Oxidant stress in hyperlipidemia-induced renal damage." Am J Physiol Renal Physiol **278**(1): F63-74.
- Scholz, R. W., D. A. Todhunter, et al. (1981). "Selenium content and glutathione peroxidase activity in tissues of young cattle fed supplemented whole milk diets." Am J Vet Res **42**(10): 1718-23.
- Sen, C. K. and L. Packer (1996). "Antioxidant and redox regulation of gene transcription." Faseb J **10**(7): 709-20.
- Sharma, R., A. Khanna, et al. (2000). "Transforming growth factor-beta1 increases albumin permeability of isolated rat glomeruli via hydroxyl radicals." Kidney Int **58**(1): 131-6.
- Sternberg, S. S. (1970). "Cross-striated fibrils and other ultrastructural alterations in glomeruli of rats with daunomycin nephrosis." Lab Invest **23**(1): 39-51.
- Stojanovic, T., H. J. Grone, et al. (1996). "Enhanced renal allograft rejection by inhibitors of nitric oxide synthase: a nonimmunologic influence on alloreactivity." Lab Invest **74**(2): 496-512.
- Suzuki, Y. J., H. J. Forman, et al. (1997). "Oxidants as stimulators of signal transduction." Free Radic Biol Med **22**(1-2): 269-85.
- Tamaki, K., S. Okuda, et al. (1994). "TGF-beta 1 in glomerulosclerosis and interstitial fibrosis of adriamycin nephropathy." Kidney Int **45**(2): 525-36.
- Van Goor, H., G. Ding, et al. (1994). "Macrophages and renal disease." Lab Invest **71**(4): 456-64.

- Vaziri ND, Oveisi F, et al. (1998). "Role of increased oxygen free radical activity in the pathogenesis of uremic hypertension." Kidney Int **53**(6): 1748-54.
- Vinay, P., A. Gougoux, et al. (1981). "Isolation of a pure suspension of rat proximal tubules." Am J Physiol **241**(4): F403-11.
- Virchow, R. (1860). A more precise account of fatty metamorphosis. Gryphonham, England, Gryphon Editions.
- Wang, C. and R. L. Smith (1975). "Lowry determination of protein in the presence of Triton X-100." Anal Biochem **63**(2): 414-7.
- Wheeler, D. C., R. S. Chana, et al. (1994). "Oxidation of low density lipoprotein by mesangial cells may promote glomerular injury." Kidney Int **45**(6): 1628-36.
- White, C. R., V. Darley-USmar, et al. (1996). "Circulating plasma xanthine oxidase contributes to vascular dysfunction in hypercholesterolemic rabbits." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(16): 8745-9.
- Winterbourn, C. C. (1985). "Comparative reactivities of various biological compounds with myeloperoxidase-hydrogen peroxide-chloride, and similarity of the oxidant to hypochlorite." Biochim Biophys Acta **840**(2): 204-10.
- Woenckhaus, C., A. Kaufmann, et al. (1998). "Hypochlorite-modified LDL: chemotactic potential and chemokine induction in human monocytes." Clin Immunol Immunopathol **86**(1): 27-33.
- Yamada, T. and M. B. Grisham (1991). "Role of neutrophil-derived oxidants in the pathogenesis of intestinal inflammation." Klin Wochenschr **69**(21-23): 988-94.
- Yokozawa T, D. E., Oura H, Kashiwagi H, Nonaka G, Nishioka I. (1997). "Magnesium lithospermate B suppresses the increase of active oxygen in rats after subtotal nephrectomy." Neptron **75**(1): 88-93.
- Yoshioka, T. and I. Ichikawa (1994). "Cellular defence mechanisms against ischemic and toxic injury." Nephrol Dial Transplant **9**([Suppl. 4]): 34-36.

Erklärung nach §2 Abs. 2 Nrn. 5 und 6

Ich erkläre, daß ich die der Medizinischen Hochschule Hannover zur Promotion eingereichte Dissertation mit dem Titel

Oxidativer Streß bei Hyperlipidämie-induzierter Nierenschädigung Untersuchungen zur oxidativ / antioxidativen Balance

In der Abteilung Nephrologie der Medizinischen Hochschule im Zentrum Innere Medizin (Leitung: Prof. Dr. H. Haller) unter Betreuung von Herrn Prof. Dr. W. Gwinner mit der Unterstützung durch Herrn Prof. Dr. H.-J. Gröne (DKFZ Heidelberg) ohne sonstige Hilfe durchgeführt und bei der Abfassung der Dissertation keine anderen, als die dort aufgeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Ich habe diese Dissertation bisher an keiner in- oder ausländischen Hochschule zur Promotion eingereicht.

Weiterhin versichere ich, daß ich den beantragten Titel bisher noch nicht erworben habe.

Ergebnisse der Dissertation wurden in folgenden Publikationsorganen veröffentlicht:

Oxidant Stress in Hyperlipidemia-Induced Renal Damage A non-interventional analysis in rats with and without glomerulonephritis

*Hartmut Scheuer, Wilfried Gwinner, Jan Hohbach, Elisabeth F. Gröne,
Ralf P. Brandes, Ernst Malle, Christoph J. Olbricht, Autar K. Walli,
Herrmann-Josef Gröne*
Am. J. Physiol., Vol. 278,1: F63-F74, Jan. 2000

Pivotal role of xanthine oxidase in the initiation of tubulointerstitial renal injury in rats with hyperlipidemia.

Wilfried Gwinner, Hartmut Scheuer, Herrmann Haller, Ralf P. Brandes, Herrmann-Josef Gröne
Kidney Int. 2006 Feb;69(3):481-7.

Hannover, den 26.05.2007

