

Aus dem Medizinischen Zentrum für Kinder- und Jugendmedizin
Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. R. F. Maier

des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg

in Zusammenarbeit mit dem Universitätsklinikum Gießen und Marburg
GmbH, Standort Marburg

**Funktion der Cyclooxygenaseisoformen
an einem Tiermodell des Hyperprostaglandin-E2-Syndroms/
antenatalen Barttersyndroms**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Zahnmedizin

dem Fachbereich Medizin der
Philipps-Universität Marburg
vorgelegt

von

Katja Beinhorn
aus Erfurt

Marburg 2005

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg

am: 3. November 2005

gedruckt mit Genehmigung des Fachbereiches

Dekan: Prof. Dr. B. Maisch

Referent: Prof. Dr. R. M. Nüsing

1. Koreferent: Prof. Dr. L. Flores-de-Jacoby

2. Koreferent: Prof. Dr. B. Krämer

Inhaltsverzeichnis

I. Einleitung

I.1. Das Bartter- und verwandte Syndrome	1
I.2. Das Hyperprostaglandin-E2-Syndrom oder antenatale Barttersyndrom (HPS/aBS)	1
I.3. Struktur, Eigenschaften und Funktionsprinzip des Furosemids	4
I.4. Wirkungsort des Furosemid und Wirkungsweise des NKCC2	5
I.5. Furosemid am Tiermodell	8
I.6. Prostaglandinsynthese- und inaktivierung	9
I.7. Prostaglandinwirkung	11
I.8. Cyclooxygenase 1 und 2	13
I.9. Cyclooxygenase in der Niere	14
I.10. Hemmstoffe der Prostaglandinsynthese	15
I.11. Fragestellung der Arbeit	17

II. Material und Methoden

II.1. Material	
II.1.1. Materialien	19
II.1.2. Geräte	20
II.2. Methoden	
II.2.1. Protokoll der Stoffwechselkäfige	21
II.2.2. Verabreichung der Medikamente	23

II.2.3.	Versuchsablauf für die Gewinnung des Plasmas	24
II.2.4.	Der Enzymimmunoassay	27
II.2.4.1.	Bestimmung des Prostaglandins E ₂ aus dem Urin	28
II.2.4.2.	Standardkurve	28
II.2.4.3.	Spezifität des Tests	28
II.2.4.4.	Bestimmung des ADH - Arg ⁸ -Vasopressins- aus dem Mausplasma	29
II.2.4.5.	Standardkurve	29
II.2.4.6.	Spezifität des Tests	29
II.2.5.	Die Proteinbestimmung	30
II.2.5.1	Die quantitative Bestimmung der Proteine im Urin	30
II.2.5.2	Herstellung der Standardkurve	30
II.2.5.3	Durchführungsvorschrift	31
II.2.5.4.	Pipettiervorschrift	31
II.2.5.5.	Spezifität des Tests	32
II.2.6.	Die Elektrolytbestimmung aus dem Urin	32
II.2.7.	Die Reninbestimmung im Plasma	33
II.2.8.	Die Bestimmung des Furosemids im Urin	33
II.2.9.	Die Herstellung der Furosemidlösung	34
II.3.	Statistik	35

III. Ergebnisse	
III.1. Furosemid im Urin	36
III.2. Gewichtsbilanz	37
III.3. PGE ₂ im Urin	39
III.4. Diurese	41
III.5. Elektrolyte Na ⁺ und K ⁺ im Urin	43
III.6. Trinkvolumen	46
III.7. Renin im Plasma	48
III.8. ADH im Plasma	50
III.9. Protein im Urin	52
IV. Diskussion	54
V. Zusammenfassung	69
VI. Literaturverzeichnis	71
VII. Anhang	
VIII.1. Lebenslauf	79
VIII.2. Akademische Lehrer	80
VIII.3. Danksagung	81
VIII.4. Ehrenwörtliche Erklärung	82

I. Einleitung

Die Einleitung fasst die wichtigsten Aspekte vom Krankheitsbild des Hyperprostaglandin-E2-Syndroms/antenatalen Barttersyndroms (HPS/aBS) zusammen, erläutert den Zusammenhang zwischen diesem und der Gabe des Schleifendiuretikums Furosemid und gibt einen Überblick über den Arachidonsäurestoffwechsel, sein Schlüsselenzym, die Cyclooxygenase und dessen gebildete Metabolite unter spezieller Berücksichtigung der Niere.

I.1. Das Bartter- und verwandte Syndrome

Im Jahr 1962 beschrieb Bartter zwei Patienten, die vor allem durch eine hohe Aldosteron- und Reninaktivität, Hyperkaliurie, metabolischer Alkalose und Hyperplasie des juxtaglomerulären Apparates auffielen. Er fasste diese Erscheinungen unter dem Begriff Barttersyndrom zusammen [Bartter et al, 1962].

Die folgenden Veröffentlichungen zeigten, dass sowohl in Bezug auf die Klinik als auch auf die Pathogenese eine deutliche Heterogenität dieses Krankheitsbildes vorliegt [Gitelman et al, 1966; Fanconi et al, 1971; Seyberth et al, 1985; McCredie, 1996]. Daher wird das Barttersyndrom heute in vier phänotypisch verschiedene Formen eingeteilt: das klassische Barttersyndrom (cBS), die hypokalziurisch-hypomagnesiämische Variante oder Gitelmansyndrom (GS), die antenatale hyperkalziurische Form (HPS) mit Taubheit (BSND-Barttersyndrome with sensorineural deafness) und das Hyperprostaglandin-E2-Syndrom oder antenatale Barttersyndrom (HPS/aBS) [Schwartz et al, 1996; Seyberth et al, 1998; Jeck et al, 2001].

I.2. Das Hyperprostaglandin-E2-Syndrom oder antenatales Barttersyndrom (HPS/aBS)

Das HPS/aBS wird in der Literatur auch als FSLT (Furosemide-like salt-losing tubulopathy) oder Hyperkalziurisches Bartter-Syndrom beschrieben [Köckerling et al, 1998].

Dieses seltene, jedoch lebensbedrohliche Krankheitsbild, tritt bei ungefähr einer von 50.000 Geburten in Erscheinung. Der genaue Erbgang ist noch ungeklärt, gleichwohl wird aufgrund des Auftretens bei mehreren Geschwistern und phänotypisch gesunden Eltern davon ausgegangen, dass es sich um einen autosomal-rezessiven Erbgang handelt [Seyberth et al, 1994].

Das HPS/aBS manifestiert sich bereits pränatal ab der 22. Schwangerschaftswoche und zeichnet sich vor allem durch eine fetale Polyurie aus. Diese führt gegen Ende des sechsten Schwangerschaftsmonats zur Ausbildung eines Polyhydramnions, einhergehend mit bis zu zehn Litern Fruchtwasser, und wird für die hohe Frühgeburtsrate mitverantwortlich gemacht [Jeck et al, 2001]. Postnatal steht die Polyurie mit dem zu Beginn sehr hohen Verlust von Natrium und Chlorid im Vordergrund. Die renale Kaliumausscheidung ist in der Anfangszeit noch physiologisch, allerdings tritt im weiteren Verlauf der Krankheit eine Hyperkaliurie mit einer hyperkaliämischen Alkalose auf [Fanconi et al, 1971]. Ein weiterer Symptomkomplex dieser Krankheit ist die Hyperkalziurie, die bereits in den ersten Lebenswochen zur Nephrokalzinose führen kann [Shoemaker et al, 1993].

Polyurie und Salzverlust korrelieren mit einer massiv erhöhten renalen Ausscheidung des Prostaglandin E₂ (PGE₂) und dessen Hauptmetaboliten PGE-M, während die Ausscheidung anderer Prostaglandine, wie z.B. PGI₂, fast unbeeinflusst ist [Seyberth et al, 1985]. Die gesteigerte Ausscheidung ist für die Namensgebung der Krankheit „Hyperprostaglandin-E₂-Syndrom“ verantwortlich.

Molekulargenetisch wurden bei Patienten mit HPS/aBS Mutationen im apikalen NKCC2-Kotransporter (*NKCC2*-Gen auf Chromosom 15q15-21) [Simon et al, 1996a] und im apikalen K⁺-Kanal ROMK (*KCNJ1*-Gen auf Chromosom 11q24-25) festgestellt [Simon et al, 1996b; Karolyi et al, 1997]. Diese beiden Proteine werden in der apikalen Membran des dicken, ascendierenden Schenkels der Henle-Schleife (TALH-„thick ascending limb of henle’s loop“) exprimiert und sind für die Rückresorption von 20-30 % des filtrierten Kochsalzes bei gesunden Personen verantwortlich. Eine Mutation von einem der beiden Kanäle führt zu einer fehlgesteuerten Chloridrückresorption, die sich in einer gestörten Konzentrationsfähigkeit und dann in einem erhöhten Wasser- und Elektrolytverlust auswirkt.

Es zeigt sich das typisch klinische Bild einer Furosemid-ähnlichen Tubulopathie mit Salurese, Polyurie, Hypermagnesiurie und Hyperkalziurie [Greger et al, 1998]. Im Verlauf der letzten Jahre wurden Mutationen an weiteren elektrolytregulierenden Proteinen, wie z.B. dem CIC-Kb-Kanal beschrieben, auf die in dieser Arbeit aber nicht weiter eingegangen werden soll.

Neben dem primär tubulären Resorptionsdefekt spielt die sekundäre PGE₂-Erhöhung eine wichtige Rolle. Vermutlich wird als Gegenregulation zur Aufrechterhaltung der Nierenfunktion vermehrt PGE₂ ausgeschüttet. Dieses hemmt wahrscheinlich zusätzlich die basolaterale Chloridresorption, die Natriumresorption am Sammelrohr und antagonisiert den ADH-abhängigen Wassertransport. Der tubuläre Wasser- und Salzverlust wird durch diese Vorgänge noch weiter erhöht. Die genauen Zusammenhänge sind allerdings im Detail noch ungeklärt.

Die klinischen Symptome, wie Fieberzustände, Übelkeit, Erbrechen, sekretorische Diarrhö und Störungen des Knochenstoffwechsels (Osteopenie), werden nach heutiger Meinung ebenfalls durch die systemisch hohen PGE₂-Spiegel bedingt [Seyberth et al, 1998]. Bei den erkrankten Kindern werden häufig Wachstumsretardierungen beobachtet [Seidel et al, 1995].

Die Suppression der sekundären PGE₂-Produktion ist der Hauptangriffspunkt der derzeitigen Behandlung des HPS/aBS. Indometacin, ein nichtselektiver Cyclooxygenase-Hemmer, ist nach den heutigen Erkenntnissen das Mittel der Wahl [Seyberth et al, 1998]. 1999 berichteten Konrad et al über eine erfolgreiche pränatale Indometacintherapie, die nach molekulargenetischer Diagnose an Amnionzellen eingeleitet wurde. Dabei konnte eine Reduzierung des Polyhydramnions und eine Verlängerung der Schwangerschaft erreicht werden [Konrad et al, 1999]. Die Therapie postnatal besteht in einer ausreichenden Elektrolyt- und Flüssigkeitszufuhr in Verbindung mit einer einschleichenden Indometacinbehandlung. Indometacin wird bei Kleinkindern beispielsweise in Form von Amuno[®]-Saft verabreicht. Andere nicht-steroidale Antiphlogistika, z.B. Acetylsalicylsäure, weisen, neben verstärkten gastrointestinalen Nebenwirkungen, eine verminderte Wirksamkeit bei der Senkung der renalen und systemischen PGE₂-Synthese auf [Seyberth et al, 1994].

Durch die Indometacinbehandlung wird bewirkt, dass Dehydrationszustände, Elektrolytmangelzustände und die daraus resultierenden psycho-motorischen Schäden gering gehalten werden.

Als Nachteile der Indometacinbehandlung sind zu nennen: die Maskierung von Infektionserkrankungen durch das Ausbleiben von Fieber, unter Umständen eine chronisch progrediente Niereninsuffizienz und aufgrund der geringen therapeutischen Breite die Gefahr eines akuten Nierenversagens und gastrointestinaler Komplikationen [Köckerling et al, 1997].

Trotz der guten klinischen Erfolge ist es aufgrund der eben genannten Nebenwirkungen nicht voraussagbar, wie lang die Indometacintherapie fortgeführt werden kann.

In dieser Arbeit wird das Schleifendiuretikum Furosemid verwendet, um das HPS/aBS tierexperimentell zu imitieren, dessen Pathophysiologie zu studieren und weitere Erkenntnisse über diese Erkrankung zu erlangen. Deshalb soll an dieser Stelle speziell auf die Struktur, die Eigenschaften und das Funktionsprinzip des Furosemids sowie auf dessen Auswirkungen im Tiermodell eingegangen werden.

I.3. Struktur, Eigenschaften und Funktionsprinzip des Furosemids

Furosemid ist ein Diuretikum - ein „harntreibendes Mittel“ - und wird zur Klasse der Schleifendiuretika gezählt. (Abb.1)

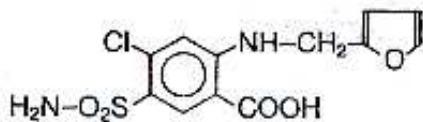


Abb.1: Strukturformel des Furosemids

Furosemid besitzt eine hohe Plasmabindungs­fähigkeit, über 95 % liegen an Albumin gebunden vor. Durch diese hohe Affinität wird die glomeruläre Filtration in der Niere stark minimiert.

Im proximalen Tubulus befinden sich sekretorische Pumpen, die eine noch stärkere Affinität zu diesem Diuretika besitzen, als Albumin. Furosemid wird so durch die Zelle ins Lumen geschleust. Von dort aus gelangt es zu seinem Angriffspunkt [Shankar et al, 2003]. Es hemmt in seiner anionischen Form den NKCC2-Kotransporter im dicken, ascendierenden Schenkel der Henle-Schleife reversibel.

Für diesen inhibitorischen Effekt ist eine sehr hohe Wirkstoffkonzentration im Tubuluslumen notwendig: etwa 10-20 mal höher, als die Plasmakonzentration. Diese wird durch tubuläre Sekretion und durch Konzentration mittels Flüssigkeitsresorption erreicht. Der diuretische Effekt nach der Verabreichung setzt schnell ein. Er hält aber nur für vier bis sechs Stunden an, was in der kurzen Plasmahalbwertszeit des Furosemids begründet liegt [Brater et al, 1998]. Furosemid wird rasch im Darm resorbiert [Giebisch et al, 1972]. Es wird zu einem Drittel über die Galle und den Faeces und zu zwei Dritteln über die Niere im Urin - in der aktiven Form - ausgeschieden [Beermann et al, 1984].

I.4. Wirkungsort des Furosemids und Wirkungsweise des NKCC2

Der NKCC2 ist ein nierenspezifischer Kotransporter und wird zum einen in den epithelialen Zellen des TALH-Segmentes bei Mäusen vorgefunden [Ecelbarger et al, 1996; Mount et al, 1999]. Hier ist er für die Resorption der Na^+ , K^+ und Cl^- zuständig [Greger et al, 1985].

Zum anderen wird der NKCC2-Kotransporter auch in Zellen des distalen Tubulus, der Macula densa, bei Ratten exprimiert [Nielsen et al, 1998]. In der Macula densa befinden sich spezifische Zellen, die im Lumen den Chloridgehalt messen, und entsprechend dieser Konzentration lösen sie die Freisetzung von Renin aus den juxtaglomerulären Zellen aus [Schnermann et al, 1976]. Dieser Mechanismus wird als tubulo-glomeruläres Feedback bezeichnet.

Beim Menschen wird Renin unter physiologischen Bedingungen ausgeschüttet, wenn die Barorezeptoren im juxtaglomerulären Bereich der Niere eine Abnahme der lokalen Durchblutung registrieren. Durch das proteolytisch wirkende Gewebshormon Renin wird das in der Leber gebildete Angiotensinogen in Angiotensin I umgewandelt. Hieraus entsteht durch das Angiotensin converting enzyme (ACE) Angiotensin II, welches selbst drei Vorgänge auslöst: Steigerung des arteriellen Blutdrucks, Durstgefühl/Trinken und die Aldosteronfreisetzung aus der Nebenniere.

Der NKCC2-Kotransporter gehört zur Familie der Kationen-gekoppelten Chloridkotransporter, wie z.B. der Na-Cl- und K-Cl-Kotransporter. Dieser Kotransporter ist ein sehr großes Protein, bestehend aus 1100 Aminosäuren mit zwölf membranständigen Helixen und hat ein molekulares Gewicht von 120 kDa [Obermüller et al, 1996; Haas et al, 2000].

Zu Beginn eines regelrecht unbeeinflussten Transportzyklus wird an diesem Na^+ gebunden, dann folgen das erste Cl^- , anschließend das K^+ und zuletzt das zweite Cl^- . Wenn alle Ionen am Carrier gebunden vorliegen, kommt es zu einer Konformationsänderung und sie bekommen Zugang zum Zellinneren. Mit jedem Transportvorgang werden somit 1Na^+ , 1K^+ und 2Cl^- verschoben. Dieser Vorgang ist elektroneutral. Die in der basolateralen Membran lokalisierte $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ erzeugt einen steilen elektrochemischen Gradienten für den Einstrom von Natrium in die Zelle. Angetrieben durch diesen Gradienten, befördert der Furosemid-sensitive NKCC2-Kotransporter 1Na^+ zusammen mit 1K^+ und 2Cl^- vom Tubuluslumen in die Zelle. Da die luminale Konzentration des Kaliums wesentlich geringer ist, wird es über den Kaliumkanal ROMK dem Lumen wieder zugeführt. Dies ist von Bedeutung, um die kontinuierliche Funktion des Transporters zu gewährleisten. Durch die Chloridresorption kommt es zum Aufbau einer elektrischen Spannung über dem Epithel, welches seinerseits die parazelluläre Ca^{2+} - und Mg^{2+} -Resorption fördert. Cl^- verlässt die Zelle über einen an der basolateralen Membran angebrachten Chloridkanal CIC-Kb oder im Cotransport mit Kalium. Natriumionen gelangen über das $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ -System aus der Zelle.

Die Hemmung des Kotransporters beruht auf der Bindung des Furosemids an der zweiten Cl⁻ Bindungsstelle, welche die Konformationsänderung des Carriers verhindert. Als Konsequenz dieser Hemmung bricht das lumenpositive Potential zusammen und die Resorption der Ionen aus dem Urin sistiert. (Abb.2)

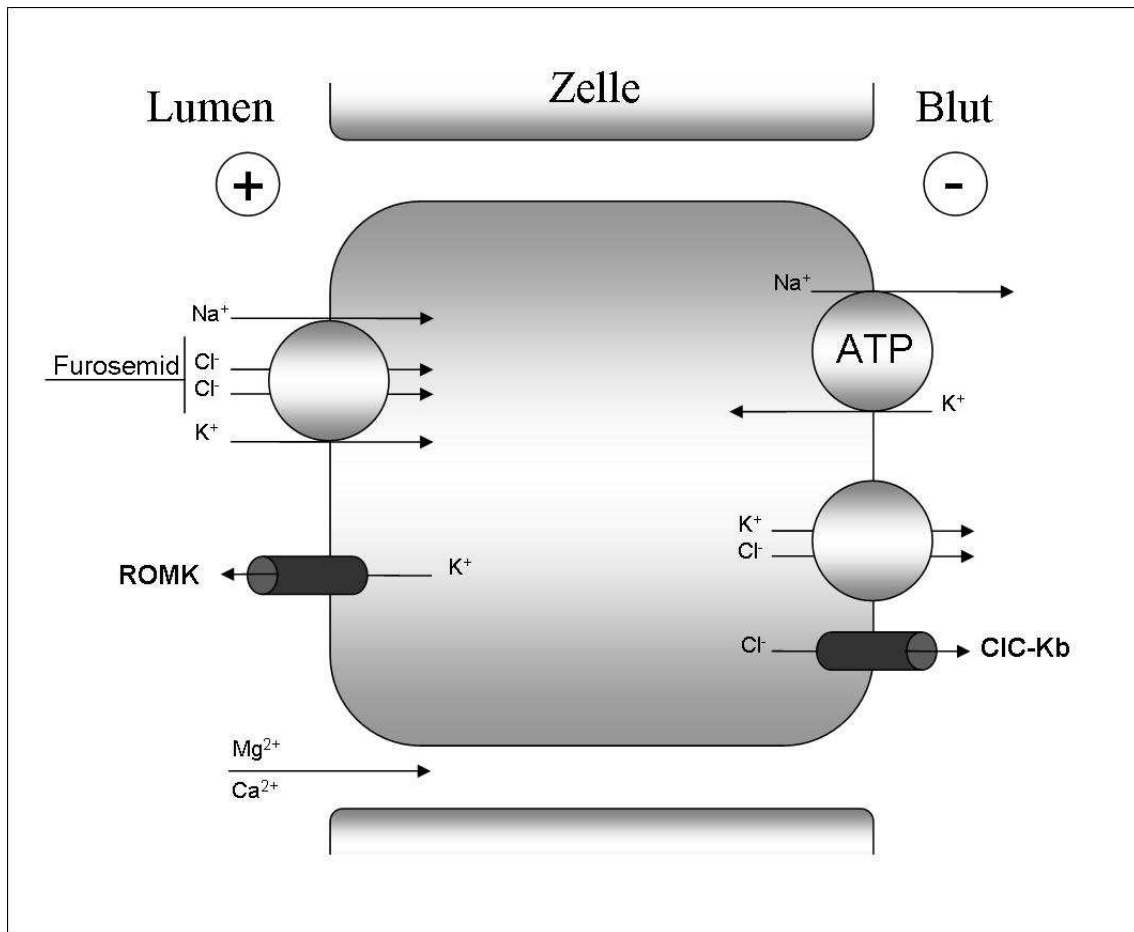


Abb.2: Schema des Elektrolyttransportes im dicken ascendierenden Schenkel der Henle-Schleife, Pfeil=Diffusion, Kreis=carriervermittelter Transport
Schleifendiuretika wie Furosemid hemmen den Na⁺-K⁺-2Cl⁻-Kotransporter

Die funktionelle Verknüpfung der Kanäle miteinander, vor allem die des Kaliumkanals ROMK mit dem NKCC2-Kotransporter, ist bedeutend für einen physiologischen Wasser- und Elektrolythaushalt. Patienten, bei denen eines dieser Proteine einen Defekt aufweist, erleiden schwere Flüssigkeits- und Salzverluste [Peters et al, 2002].

Die diuretische Wirkung von Furosemid ist auf zwei verschiedene Wege zurückzuführen: Zum einen auf den direkten, dem COX2 unabhängigen Weg, der über die Blockade des NKCC2-Kotransporters den Salztransport vermindert. Zum anderen auf den indirekten Weg, bei dem es durch die Vermehrung der COX2 abhängigen Prostaglandine zu einer gesteigerten Hemmung des Salztransportes kommt. Wahrscheinlich sind beide Mechanismen bei Patienten mit dem HPS/aBS von Bedeutung [Nüsing et al, 2004].

I.5. Furosemid im Tiermodell

Um die Pathophysiologie des HPS/aBS zu erforschen, ist die Verwendung von Furosemid am Tiermodell der Maus oder Ratte gut geeignet. Durch die Verabreichung von Furosemid über einen längeren Zeitraum kommt es zu ähnlichen Symptomen, wie sie bei den HPS/aBS- Patienten aufzufinden sind.

In vorausgegangen Studien wurde festgestellt, dass sich die Verwendung dieses Schleifendiuretikums bei jungen Tieren negativ auf das Wachstum auswirkt. Im Vergleich zum unbehandelten Tier war die Körpergröße von jungen Ratten deutlich reduziert. Durch die Supplementation von Elektrolyten gelang es, den Minderwuchs zu verhindern und auch die mit Furosemid behandelten Tiere wiesen danach eine normale Körpergröße auf [Pine et al, 1987].

Das Auftreten einer Nephrokalzinose wurde bisher nur an der Ratte beschrieben; an der Maus konnte sie noch nicht gezeigt werden. Sie wird in direkten Zusammenhang mit der Hyperkalziurie der Tiere gebracht [Hufnagle et al, 1982]. Dieses Problem ist auch beim Menschen bekannt. Neugeborene, die z.B. eine Erkrankung der Lunge oder einen Herzfehler aufweisen, werden mit Furosemid behandelt. Diese Kinder entwickeln im Alter von 1-2 Jahren häufig Nephrokalzinosen, die dann zu einer pathologischen Nierenfunktion führen können [Downing et al, 1992].

An jungen Ratten wurde eine renale Hypertrophie, vor allem der Nierenrinde, nachgewiesen, wenn diese über einen Zeitraum von sechs Wochen Furosemid während der Wachstums- und Entwicklungsphase erhielten.

Es wird angenommen, dass diese Veränderung durch Angiotensin II, ein wichtiger renaler Wachstumsfaktor, bedingt ist [Wolf et al, 1993]. Bei erwachsenen Ratten konnte diese Veränderung nach der gleichen Behandlung nicht festgestellt werden [Fogo et al, 1990].

Wie bereits erwähnt, geht das HPS/aBS mit einer vermehrten Ausscheidung von PGE₂ und seinem Hauptmetaboliten PGE-M einher. Jedoch ist die Prostaglandinfreisetzung nicht das primäre pathologische Ereignis, sondern vielmehr eine Folge, der eine wesentliche Rolle im Verlauf dieser Krankheit zugeschrieben wird [Nüsing et al, 1990]. Es werden mindestens zwanzig natürliche, chemisch unterschiedliche Prostaglandine unterschieden.

Die Prostaglandine werden normalerweise nicht in Zellen oder Geweben gespeichert, sondern auf unterschiedliche Stimuli hin freigesetzt. Es sind Substanzen mit hormonartiger Wirkung, die hauptsächlich das Gewebsareal beeinflussen, in dem sie produziert werden. Daher werden sie auch als Gewebshormone (Autacoide) bezeichnet [Nageshi et al, 1993].

I.6. Prostaglandinsynthese- und inaktivierung

Die Menge der produzierten Prostaglandine hängt stark vom Angebot der Arachidonsäure, einer mehrfach ungesättigten Fettsäure, ab. (Abb.3)

Da diese aber nur in geringen Mengen frei vorliegt, ist eine Mobilisierung der Fettsäure aus endogenen Speichern erforderlich. Hier spielen die Phospholipide der Zellmembran eine wichtige Rolle. Nach der Freisetzung aus den Phospholipiden der Zellmembran durch die Phospholipase A₂, steht die Arachidonsäure als wichtigstes Substrat für die Bildung von Eicosanoiden zur Verfügung.

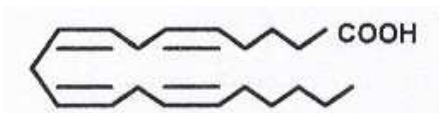


Abb.3: Strukturformel der Arachidonsäure

Die Arachidonsäure wird auf drei Wegen metabolisiert: auf dem Cyclooxygenase- und dem Lipoxygenaseweg sowie über den Weg der Cytochrom P-450 Epoxygenasen. (Abb.4)

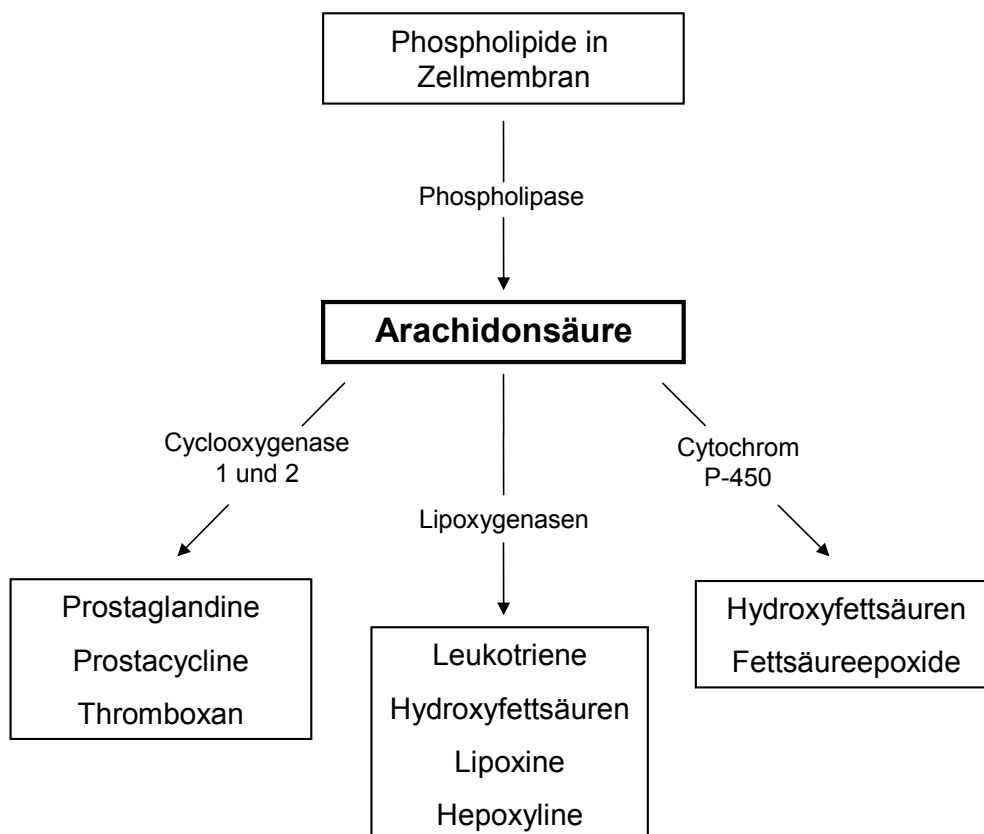


Abb.4: Synthesewege der Eicosanoide

Schlüsselenzym für die Bildung von Prostaglandinen ist die Prostaglandin-Endoperoxid-Synthase, die auch Cyclooxygenase (COX) genannt wird.

Sie bildet aus der Arachidonsäure das zyklische Endoperoxid PGH_2 [Vane et al, 1971]. PGH_2 ist wiederum das Substrat für die Bildung der klassischen Prostaglandine (PGD_2 , PGE_2 und $\text{PGF}_{2\alpha}$), des Prostacyclins (PGI_2) und des Thromboxans (TXA_2) [Samuellsen et al, 1983]. (Abb.5)

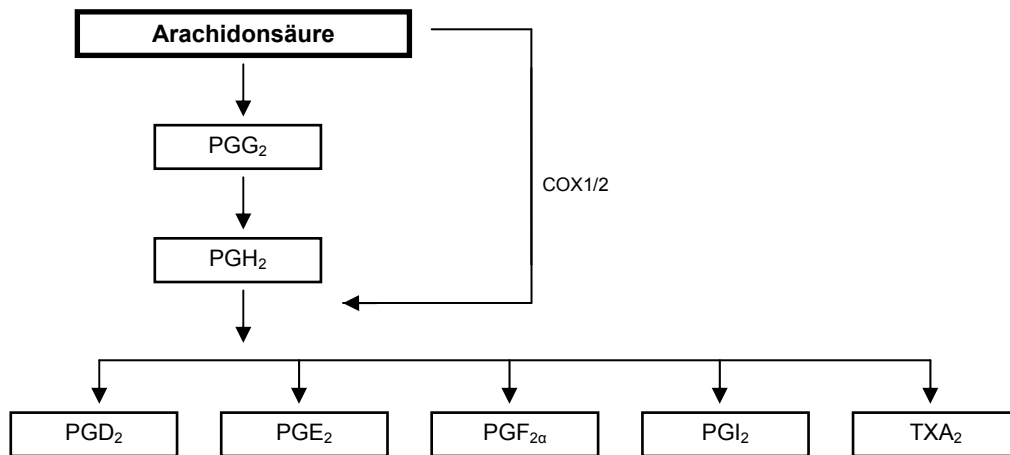


Abb.5: Der Cyclooxygenaseweg

Zirkulierende Prostaglandine werden überwiegend in der Lunge - bei einer einzigen Passage bis zu 90% - enzymatisch inaktiviert. Durch die Inaktivierung über die Lunge wird dafür gesorgt, dass keine großen Mengen an Prostaglandinen in den Körperkreislauf gelangen. Der weitere Abbau erfolgt vorwiegend in der Leber.

I.7. Prostaglandinwirkung

Die natürlich gebildeten Prostaglandine kommen nicht nur in allen Geweben - Ausnahme Erythrozyten - vor, sondern können auch an verschiedenen Organen und Organsystemen wirken. Daher ist der gezielte therapeutische Einsatz von Prostaglandinen erschwert und eine erwünschte Wirkung kann von vielen Nebenwirkungen begleitet sein.

Die biologische Wirkung von Prostaglandinen ist außerordentlich komplex. (Abb.6)

Das breite Wirkungsspektrum soll hier am Beispiel des PGE₂ gezeigt werden:

- bei erhöhten PGE₂-Werten wird eine erhöhte Freisetzung von Renin beobachtet
- es steigert den renalen Blutfluss und fördert die Diurese durch die Hemmung des Effekts von ADH (Vasopressin), eine anhaltende Behandlung mit Antiphlogistika und damit Hemmung der PGE₂-Synthese kann daher auch zu Nierenschäden führen
- PGE₂ erweitert die meisten regionalen Gefäßgebiete, senkt dadurch den peripheren Widerstand und den arteriellen Blutdruck
- es fördert in niedrigen Konzentrationen die Trombozytenaggregation, während es hingegen in hohen Konzentrationen hemmend wirkt
- die orale Gabe von PGE₂ führt zu einer verkürzten Darmpassagezeit, Diarrhö, Erbrechen, und kolikartigen Bauchschmerzen
- es hemmt die Magensaftsekretion und fördert Schleim- und Bicarbonatsekretion in Magen und Dünndarm
- führt zur Entstehung von Fieber und Schmerzen
- wird zur Einleitung der Geburt benutzt und kann einen Abort auslösen
- PGE₂ verfügt auch über antiphlogistische Effekte und hemmt so bei anaphylaktischen Reaktionen die Freisetzung von Histamin aus Mastzellen
- durch Beeinflussung verschiedener Lymphozytenfunktionen scheint PGE₂ die Abstoßung transplantiert Organe zu hemmen

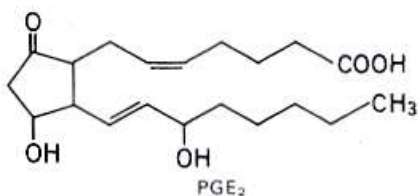


Abb.6: Strukturformel des PGE₂

Die Wirkungsdauer der Prostaglandine ist wegen ihres schnellen Abbaus sehr kurz und kann klinisch nur durch Infusion oder oraler Gabe sehr hoher Dosen über einen längeren Zeitraum aufrechterhalten werden.

Inzwischen ist es gelungen, für jeden Prostaglandintyp den dazugehörigen Rezeptor zu ermitteln. Entsprechend der höchsten Affinität für Prostaglandine der D-, F-, I- und E-Serie und TXA₂ werden sie in 5 Hauptgruppen DP, FP, IP, EP und TP eingeteilt. Innerhalb der EP-Rezeptoren unterscheidet man 4 Untergruppen (EP₁, EP₂, EP₃, EP₄). Es handelt sich immer um Rezeptoren, die an G-Proteine gekoppelt sind.

PGE₂ hat viele und manchmal, wie oben dargestellt, auch entgegengesetzte Wirkungen. Diese werden durch die Untergruppen der Rezeptoren vermittelt. So bewirken der EP₁ und EP₃-Rezeptor an der glatten Muskulatur eine Kontraktion und der EP₂ und EP₄-Rezeptor eine Relaxion [Herbert et al, 1990].

I.8. Cyclooxygenase 1 und 2

Im Jahr 1988 wurde die Cyclooxygenase COX1 von De Witt und Smith entdeckt und beschrieben [De Witt et al, 1988].

Anfang 1990 fand man heraus, dass das Enzym COX1 nicht allein für den Anstieg von Prostaglandinen und der Ausbildung der Entzündungszeichen verantwortlich sein kann. Kurz darauf wurde von Xie et al eine zweite Isoform, die COX2, entdeckt [Xie et al, 1991]. Daneben gibt es Hinweise auf eine weitere Isoform, die COX3 [Chandrasekharan et al, 2002].

Die COX1 spielt eine wesentliche Rolle bei physiologischen Prozessen („house keeping gene“). Sie wird praktisch in allen Körpergeweben konstitutiv exprimiert. Die zweite Isoform, die COX2, wird in den meisten Geweben normalerweise nur in geringen Mengen exprimiert, kann aber durch bestimmte Wachstums- und Entzündungsmediatoren, wie z.B. TNF- α induziert werden („inflammatory response gene“).

I.9. Cyclooxygenase in der Niere

Es hat den Anschein, dass die COX2 eine wichtige Rolle bei der Entwicklung der Niere, bei der Stimulation des Reninsystems - somit bei der physiologischen Funktion der Niere - und bei der Entwicklung und Funktion der weiblichen Geschlechtsorgane spielt [Khan et al, 2002]. Es wird auch eine vermehrte Produktion dieses Enzyms mit der Entstehung von Entzündungen und Schmerzen, einer Reihe von epithelialen Karzinomen, der Alzheimer-Krankheit und anderen neurologischen Schäden in Verbindung gebracht [Fossilien et al, 2000]. (Abb.7)

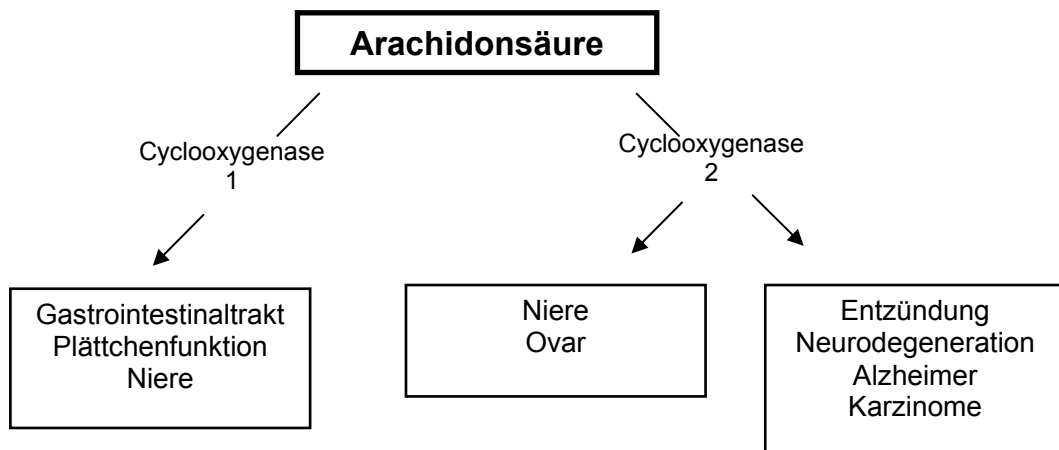


Abb.7: Die unterschiedlichen Funktionen der Cyclooxygenase 1 und 2 in physiologischen und pathologischen Prozessen

Der dominierende Ort, an dem die beiden Isoformen bisher nachgewiesen werden konnten, ist das Nierenmark. Aber auch in der Nierenrinde sind sie in geringer Konzentration aufzufinden [Yang et al, 1998].

Die Bildungsorte der beiden Isoformen in der menschlichen Niere und der molekulare Induktionsweg der Cyclooxygenasen werden zurzeit intensiv untersucht.

Es wird vermutet, dass das COX1-Protein überwiegend in den Zellen der Sammelrohre gebildet wird [Smith et al, 1978]. Es ist wahrscheinlich, dass es eine wichtige Rolle bei der Regulation des Blutflusses (Hämodynamik) und bei der Glomerulären Filtrationsrate (GFR) in der Niere spielt [Kömhoff et al, 1997].

Ebenso konnte durch die selektive Hemmung dieses Enzyms eine Störung der Blutplättchenfunktion und des Gastrointestinaltraktes aufgezeigt werden [Masferrer et al, 1994].

Die basale Bildung von COX2 ist, im Gegensatz zu COX1, in Nieren erwachsener Säugetiere nur in geringen Mengen zu beobachten. Sie wurde im dicken aufsteigenden Ast der Henle-Schleife und in den Sammelrohren gefunden [Harris et al, 1994; Yang et al, 1998].

In Nierenbiopsien bei Kindern, die unter dem HPS/aBS leiden, wurde die Expression der COX2 des Weiteren in den Zellen der Macula densa und in den Epithelzellen des distalen Tubulus nachgewiesen [Kömhoff et al, 2000]. Unter physiologischen Umständen lässt sich die COX2 nicht in diesen Zellen der menschlichen Niere auffinden [Kömhoff et al, 1997].

I.10. Hemmstoffe der Prostaglandinsynthese

Die wichtigsten Hemmstoffe der Cyclooxygenase und damit der Prostaglandinsynthese sind die nichtsteroidalen Antiphlogistika (NSAID).

Die Wirksamkeit solcher Pharmaka beruht auf der Fähigkeit, die Cyclooxygenaseaktivität zu blockieren. Der bekannteste Vertreter dieser Gruppe ist das Aspirin[®] von BAYER (Acetylsalicylsäure). Es hemmt irreversibel durch die Acetylierung des Serinrestes Ser⁵³⁰ die COX1 bzw. des Ser⁵¹⁶ die COX2 [Vane et al, 1971]. Ein Nachteil nichtsteroidaler Antiphlogistika kann die gesteigerte Biosynthese von Lipxygenase-Produkten durch die vermehrte Verfügbarkeit des Substrats Arachidonsäure bei Hemmung der Cyclooxygenase sein. Die Überproduktion von Leukotrienen wird für das „Analgetika-Asthma“ mitverantwortlich gemacht.

Die Hemmung der COX1 wird mit den unerwünschten Nebeneffekten (z.B. Verlängerung der Blutungszeit, Magenschleimhautschäden) und die Hemmung der COX2 mit den antientzündlichen Effekten in Verbindung gebracht [Warner et al, 1999].

Basierend auf der Kenntnis der unterschiedlichen Enzymfunktionen, wurde Ende der 1990er Jahre eine neue Substanzklasse entwickelt, die in der Lage ist, selektiv die COX2-Isoform zu hemmen.

Diese Gruppe wird als Subgruppe innerhalb der NSAID als Coxibe oder selektive COX2-Hemmer bezeichnet. Zu ihr zählten vier in Deutschland zugelassene Substanzen: das Celecoxib (Celebrex®), das Rofecoxib (Vioxx®), das Parecoxib (Dynastat®) und das Valdecoxib (Bextra®). Jedoch wurde Rofecoxib im Jahr 2003, nachdem es zu einem vermehrten Auftreten von Herzinfarkten und Schlaganfällen nach der Einnahme gekommen war, vom deutschen Markt genommen.

I.11. Fragestellung der Arbeit

Das übergeordnete Thema der Arbeit ist das Hyperprostaglandin-E2-Syndrom/antenatale Barttersyndrom - kurz HPS/aBS.

Dieses schwerwiegende Krankheitsbild, welches sich bereits pränatal manifestiert, ist trotz des heutigen Fortschrittes auf diesem Gebiet noch nicht vollständig erforscht. Die Inzidenz liegt bei 1:50.000 Neugeborenen, es handelt sich folglich hierbei um eine sehr selten auftretende Erbkrankheit. Wenn diese nicht schnell diagnostiziert und therapiert wird, kann es durch den starken Elektrolyt- und Wasserverlust zu bleibenden psychomotorischen Schäden kommen und zum Tode führen.

Besonders auffällig bei diesem Syndrom ist die gesteigerte renale Prostaglandinproduktion. Die erhöhten Prostaglandinwerte werden hauptsächlich für das klinische Erscheinungsbild der Patienten verantwortlich gemacht.

Wissenschaftliche Studien am Menschen sind nicht problemlos durchführbar. Die klinischen Symptome und die chemischen Veränderungen beim HPS/aBS entsprechen dem Bild einer Langzeitbehandlung mit dem Schleifendiuretikum Furosemid. Dieses Erkenntnis wird sich in dieser Arbeit zu Nutze gemacht, um die Salzverlusttubulopathie zu simulieren und die typischen Parameter dieser Erkrankung genauer zu untersuchen. Als Tiermodell wurde die Maus gewählt.

Bei dieser Spezies ist es gelungen, Knock-out-Tiere für die Cyclooxygenase 1 (COX1^{-/-}) und die Cyclooxygenase 2 (COX2^{-/-}) herzustellen, die keine COX1 bzw. COX2 synthetisieren können. Als Kontrollgruppe wurden die Wildtyp-Mäuse C57BL6 verwendet.

In diesen Versuchen wurde das Furosemid sowohl bei den genetisch unbeeinflussten als auch bei den genetisch veränderten Knock-out-Mäusen COX1^{-/-} und COX2^{-/-} angewandt.

Wichtige Fragestellungen dieser Arbeit sind: Über welche der beiden Cyclooxygenasen (COX1 oder COX2) das PGE₂ gebildet wird; ob und wie sich durch den Einsatz des Furosemids bei den drei Versuchsgruppen die diuretischen und saluretischen Parameter verändern; über und welche Beziehungen zwischen den veränderten Prostaglandinwerten und den untersuchten Parametern bestehen.

Des Weiteren werden die Wirkintensitäten von COX2-Hemmern Rofecoxib (Vioxx[®]) und Parecoxib (Dynastat[®]) mit hoch selektiven, experimentellen COX1- und COX2-Hemmern (SC560 und SC236), unter Berücksichtigung der verschiedenen Genotypen, miteinander verglichen.

Die Annäherung an diese Fragen fand einmal über einen pharmakologischen Ansatz, durch Einsatz der COX-Inhibitoren Parecoxib, Dynastat, SC236 und SC560 und einmal über einen genetischen Ansatz durch die Verwendung der Knock-out-Tiere statt.

Der Einsatz der unterschiedlich selektiven COX1- und COX2-Inhibitoren und der Knock-out-Mäuse ermöglichte es zunächst, die Bedeutung der Cyclooxygenasen getrennt voneinander zu untersuchen. Durch die Kombination der Inhibitoren gelang es, eine experimentelle „Doppel-Knock-out-Maus“ zu erschaffen. Somit war es möglich, die Bedeutung beider Cyclooxygenasen im Zusammenspiel unter dem Einfluss von Furosemid zu erforschen.

II. Materialien und Methoden

II.1. Material

II.1.1. Materialien

Furosemidpulver	Firma Sigma, Aachen
COX1-Hemmer SC560 in Pulverform	Firma Calbiochem, Schwalbach
COX2-Hemmer SC236 in Pulverform	Firma Calbiochem, Schwalbach
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Firma Roth, Karlsruhe
Dynastat [®] (Wirkstoff Parecoxib)	Firma Pharmacia, Erlangen
Vioxx [®] (Wirkstoff Rofecoxib)	Firma MSD, Haar
Forene (Wirkstoff Isofloran)	Firma Abbott GmbH, Wiesbaden
Valium (Wirkstoff Diazepam)	Firma Roche, Grenzlach-Whylen
Ketamin (Wirkstoff Ketaminhydrochlorid)	Firma cura MED, Karlsruhe
BSA (bovines Serum Albumin)	Firma Sigma, Deisenhofen
isotone Kochsalzlösung	Firma Braun, Melsungen
Mikroprobengefäß mit Heparinkugel	Firma Sarstedt, Nümbrecht
Kunststoff-Osmolaritätscup	Firma Vogel, Giessen
PGE ₂ -ELISA	Firma Amersham Biosciences, Freiburg
Arg ⁸ -Vasopressin ELISA	Firma R&D Systems, Wiesbaden-Nordenstadt
Sigma-Mikroprotein-Lösung	Firma Sigma, Deisenhofen
Mikrotiterplatte, 96wells, unbeschichtet	Firma Eppendorf, Hamburg
Universalsilikonspray	Firma RÜSCH, Sulzbach

II.1.2. Geräte

Elektrolytautomat EFOX5053	Firma Eppendorf, Hamburg
Osmometer OSMOMAT 030	Firma gonotec, Berlin
Waage	Firma Kern, Balingen
Biofuge 13	Firma HERAEUS, Osterode
Spektrometer Spektro MAX 340	Firma MWG BIOTECH, Ebersberg
Electronic Ice Cupe TM	Firma Kobe, Marburg
Perfusor segura	Firma Braun, Melsungen
Zeitschaltuhr	Firma Kobe, Marburg
beheizbarer Magnetrührer MR 2001	Firma Heidolph, Schwabach

II.2. Methoden

II.2.1. Protokoll der Stoffwechselkäfige

Es standen sechs Stoffwechselkäfige mit dem gleichen Aufbau und Sammelprinzip zur Verfügung. Diese sind durch ein Urin/Kot-Trennstück speziell zum Auffangen des Urins der Mäuse konzipiert. Ein Kunststoffschlauch bildet das Verbindungsstück zwischen dem Urin/Kot-Trennstück und dem Sammelröhrchen (15ml), in dem der Urin über 24 Stunden gesammelt wurde. Die Kunststoffröhrchen standen in Wasser, das über ein Kühlaggregat (Electronic Ice Cupe TM) auf 8°C gekühlt wurde, um eine Verdunstung des Urins zu verhindern und die Vermehrung von Bakterien zu minimieren. (Abb.8)

Nach 24 Stunden erfolgten das Einsammeln des gewonnenen Urins, das Wiegen der Tiere und der Tränken sowie das Reinigen der Käfige.



Abb.8: Bild eines Stoffwechselkäfigs

Der genaue Ablauf sah folgendermaßen aus:

Die Zeit des Versuchsendes wurde im Protokoll vermerkt, um damit die Dauer des Versuchstages bestimmen zu können. Die Trinkflaschen wurden aus den Halterungen am Käfig genommen, gewogen und die Trinkmenge berechnet. Die Sammelröhrchen mit dem Urin wurden aus dem gekühlten Wasser genommen und die Urinmenge durch Wiegen ermittelt. Die Mäuse wurden nach Entnahme aus dem Käfig in einem Becher gewogen und danach in einen Gemeinschaftskäfig gesetzt.

Aus den Käfigen sind die Futterreste und der Salzleckstein entfernt worden. Anschließend erfolgte die Reinigung des Kotauffangbehälters, des Urin/Kot-Trennstücks, des Metallgitterbodens und des Käfigs an sich mit lauwarmem Wasser und einer Bürste. Das Trocknen erfolgte mit Zellstoff. Alle zwei Tage wurden die Käfige und die Metallgitterböden mit Silikonspray besprüht, um den Abfluss des Urins zu erleichtern. Im Anschluss wurden die Käfige auf dem Versuchstisch aufgebaut, mit zwei Pelletts Futter Standard Diät und dem Salzleckstein bestückt. Neue Sammelröhrchen wurden in das gekühlte Wasser gestellt, der Kunststoffschlauch in die Röhrchen gesteckt, die Trinkflaschen auf dem Kopf stehend gewogen und an den Käfighalterungen befestigt. Die Mäuse wurden wieder in ihre Käfige gesetzt und die Anfangszeit des Versuches notiert.

Bei der Ermittlung der Basalwerte, als die Tiere nur aqua ad libidum über die Tränke erhielten, wurde über einen Perfusor das Trennstück in regelmäßigen Abständen mit destilliertem Wasser durchgespült, um Urinrückstände auf dem Scheidetrichter zu vermeiden. Der Perfusor *secura* war mit einer Zeitschaltuhr verbunden, die das Gerät immer 0 Uhr, 4 Uhr, 8 Uhr, 12 Uhr, 16 Uhr und 20 Uhr für mit 15 Minuten Strom belieferte. Die Transportgeschwindigkeit des Perfusors war auf 0,066ml/min eingestellt, wodurch bei jedem Spülvorgang genau 1ml destilliertes Wasser in das Trennstück gelangte.

Der gesammelte Urin wurde folgendermaßen abpipettiert:

- 200µl in Cups für PGE₂-ELISA, Proteinbestimmung (bei -20°C aufbewahrt)
- 200µl in Cups zur Elektrolytbestimmung (bei -20°C aufbewahrt)
- den Rest, max. 2ml, in zwei weitere Cups (bei -80°C aufbewahrt)

Die Zuchtpaare für die COX1-/- und die COX2-/- wurden freundlicherweise durch Prof. Langenbach (North Carolina) zur Verfügung gestellt. Die genetisch unveränderten Wildtyp-Mäuse stammen aus dem Zuchttierstall der Kinderklinik Marburg. Die Aufzucht in den dazugehörigen Tierräumen und die anschließende Genotypisierung erfolgten durch Frau Achenbach und Frau Treude.

Als Versuchstiere wurden nur weibliche Mäuse verwendet, um eine Verfälschung der PGE₂-Daten durch die Produktion von Prostaglandinen in der Prostata bei männlichen Tieren zu vermeiden. Das Alter der Mäuse betrug 8-12 Wochen.

Die für das Versuchsvorhaben notwendige Tierversuchsgenehmigung des Regierungspräsidiums Gießen lag vor.

II.2.2. Verabreichung der Medikamente

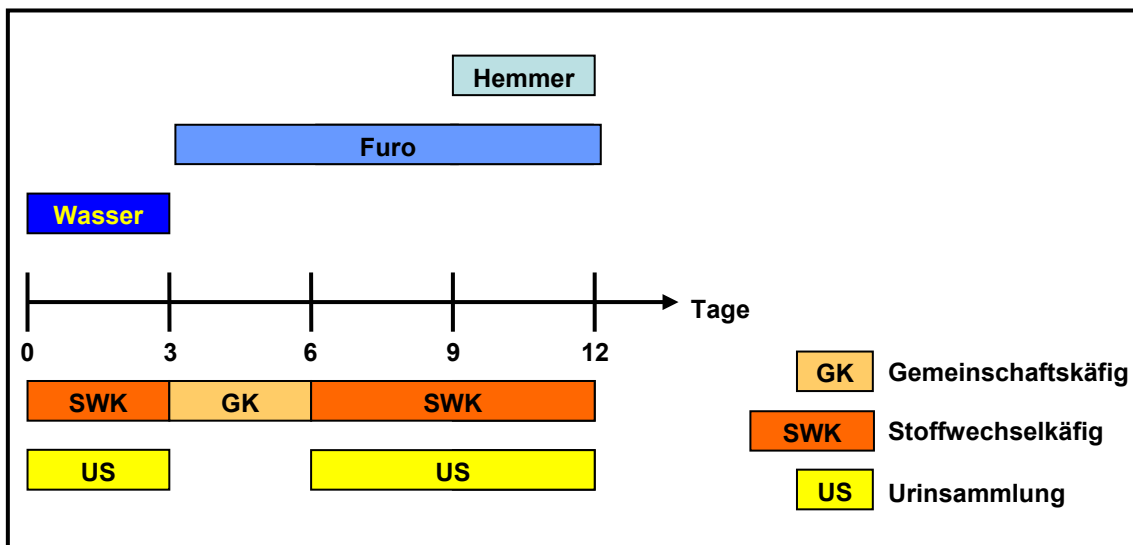


Abb.9: Versuchsablauf zur Urinsammlung

Wasser und Furosemid (1mg/ml) wurde allen drei Versuchsgruppen - den genetisch unveränderten Wildtyp-Tieren, COX1-/- und COX2-/- über die Tränke verabreicht. Als Hemmer bei den Wildtyp-Tieren kamen für je drei Tage Parecoxib (in zwei Konzentrationen: 10mg/kg, 50mg/kg), Rofecoxib, SC236, SC560 und SC236+SC560 zum Einsatz.

COX1-/-Tiere erhielten als Hemmer nur das SC236 und COX2-/- Tiere nur das SC560 für drei Tage. (Abb.9)

Die Mäuse hatten zu jedem Versuchsabschnitt, auch bei der Plasmagewinnung, einen Salzleckstein mit im Käfig.

Die Verabreichung des Medikamentes Dynastat[®] mit dem Wirkstoff Parecoxib, einem selektiven COX2-Hemmer, erfolgte subkutan. Das Medikament Vioxx[®] mit dem Wirkstoff Rofecoxib, einem selektiven COX2-Hemmer, wurde oral mit Hilfe einer Pipette aufgenommen. Die Wildtyp-Tiere erhielten 2x täglich 100µl. Die hoch selektiven COX1- und COX2-Hemmer, SC236 und SC560, wurden mit DMSO (Dimethylsulfoxid) auf eine Konzentration von 10mg/ml verdünnt und intraperitoneal (1µl/g Körpergewicht) gespritzt.

Bevor die Mäuse ein Medikament subkutan oder intraperitoneal erhielten, wurden sie in einem verschließbaren Glas mit Forene[®] betäubt.

II.2.3. Versuchsablauf für die Gewinnung des Plasmas

Für diesen Versuchsabschnitt wurden je vier Mäuse des gleichen Genotyps zu einer Gruppe zusammengefasst und in einen Gemeinschaftskäfig gesetzt. Sie erhielten alle zur selben Zeit die gleichen Substanzen. (Abb.10) (Abb.11) (Abb.12)

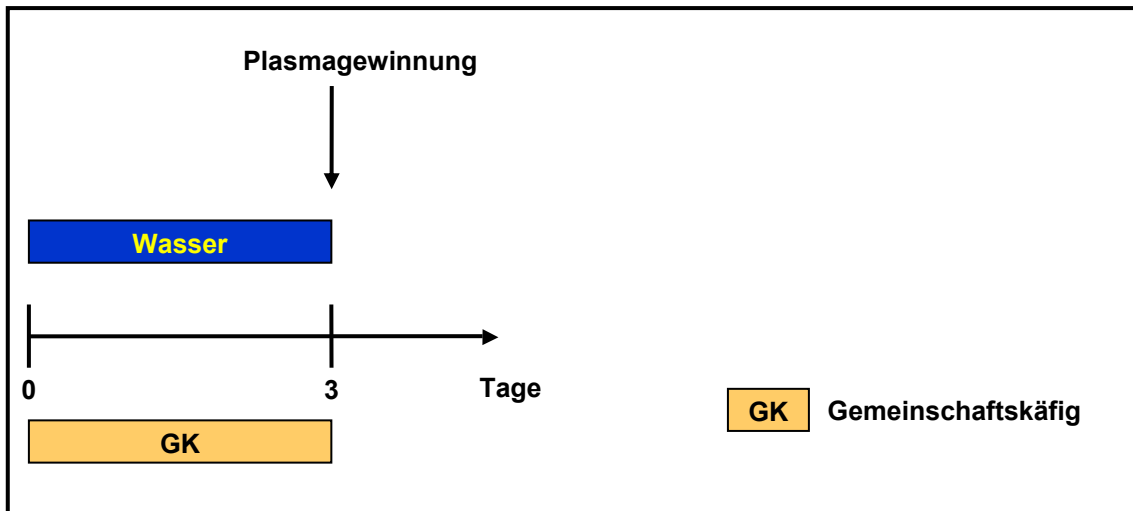


Abb.10: Versuchsaufbau zur Plasmagewinnung auf Wasser

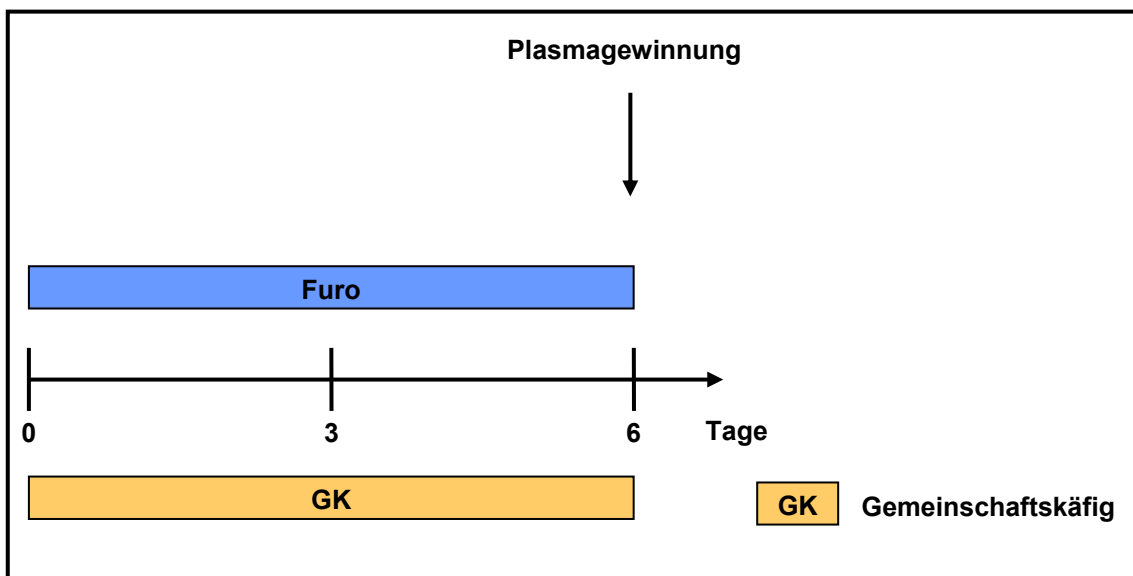


Abb.11: Versuchsaufbau zur Plasmagewinnung auf Furosemid

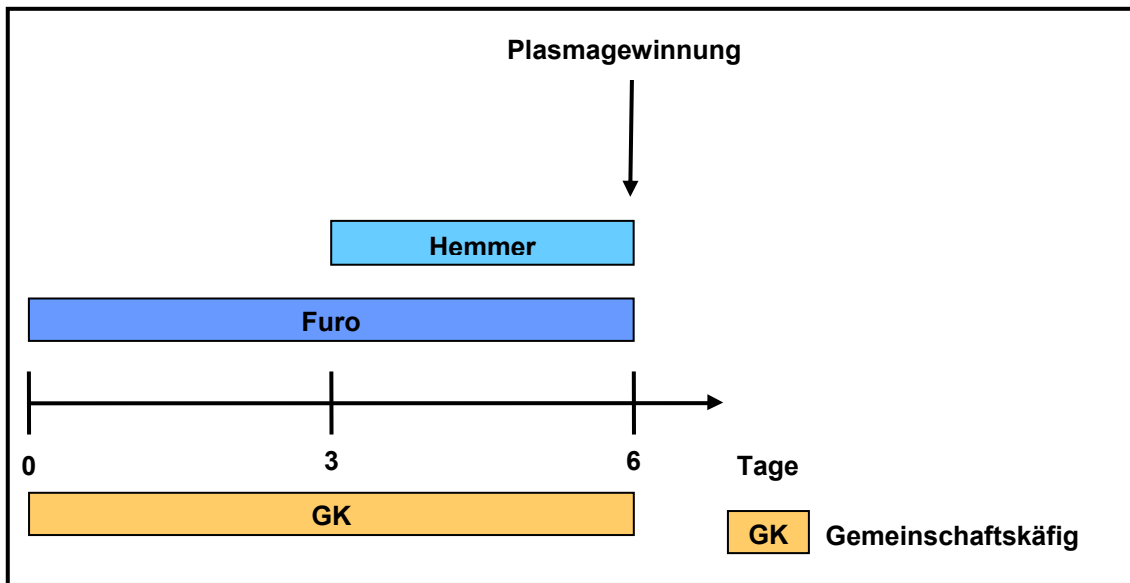


Abb.12: Versuchsablauf zur Plasmagewinnung auf Furosemid bei gleichzeitiger Gabe eines COX1- oder/und COX2-Hemmers

Die Konzentrationen und Mengen der Hemmer entsprachen denen im Stoffwechselkäfigversuch. Nur Parecoxib wurde in der Konzentration von 50mg/kg verabreicht.

Für die Plasmagewinnung wurden die Mäuse zunächst in einem Glas mit Forene kurz betäubt und danach wurde ihnen ein Narkotikum, ca. 0,6 ml pro Maus, intraperitoneal gespritzt. Das Narkotikum setzt sich aus 1ml Valium (5mg/ml), aus 1ml Ketamin (50mg/ml) und aus 9ml isotoner Kochsalzlösung zusammen.

Sobald die Maus nach Setzen von Schmerzreizen keine Reaktion mehr zeigte, konnte das Herz dargestellt und der rechte Vorhof punktiert werden. Durch diese Methode wurden ca. 400µl Blut gewonnen, die sofort in ein Mikroprobengefäß gefüllt wurden. Dieses enthielt Heparin, um die Gerinnung des Blutes zu verhindern. In einer Zentrifuge wurde das Blut für zehn Minuten bei 3800U/min zentrifugiert, darauf das überstehende Plasma abpipetiert und bei -80°C aufbewahrt. Das Plasma wurde zur Bestimmung des ADH (Arg⁸-Vasopressins) und der Reninaktivität verwendet.

II.2.4. Der Enzymimmunoassay

Die Enzymassaymethoden vereinen die hohe Spezifität der Antikörper mit der Empfindlichkeit spektrophotometrisch einfach auswertbarer Enzymtests. Benutzt werden Antikörper oder Antigene, die mit hoher Wechselzahl an einfach zu bestimmende Enzyme kovalent binden können.

Das Prinzip des hier verwendeten Enzymimmunoassays beruht auf der Konkurrenz zwischen der zu untersuchenden Substanz, dem freien Antigen, und einer bekannten Menge eines Enzym-gekoppelten Antigens um eine limitierte Anzahl von Bindungsstellen an einem für das Antigen spezifischen Antikörper (1.AK). Der Antikörper gebundene Enzymligand wird durch einen zweiten Antikörper (2.AK) immobilisiert. Mit diesem zweiten Antikörper ist die Mikrotiterplatte beschichtet, wie Abb.13 verdeutlicht. Dadurch kann der ungebundene Ligand leicht abgewaschen werden.

Um die Menge an ungebundenen markierten Antigenen festzustellen, wird eine chromogene Lösung (Tetramethylbenzin/TMB) zugesetzt. Diese bildet zusammen mit dem Enzym ein farbiges Endprodukt, wobei die Farbintensität der Menge der zu untersuchenden Substanz in der Probe oder in dem Standard proportional ist [Williams und Willsson et al, 1984]. Diese Reaktion wird durch Zugabe einer Säurelösung (1M H₂SO₄) beendet. Anschließend wird die Absorption des farbigen Endproduktes bei 450nm im Spektrometer gemessen und ausgewertet.

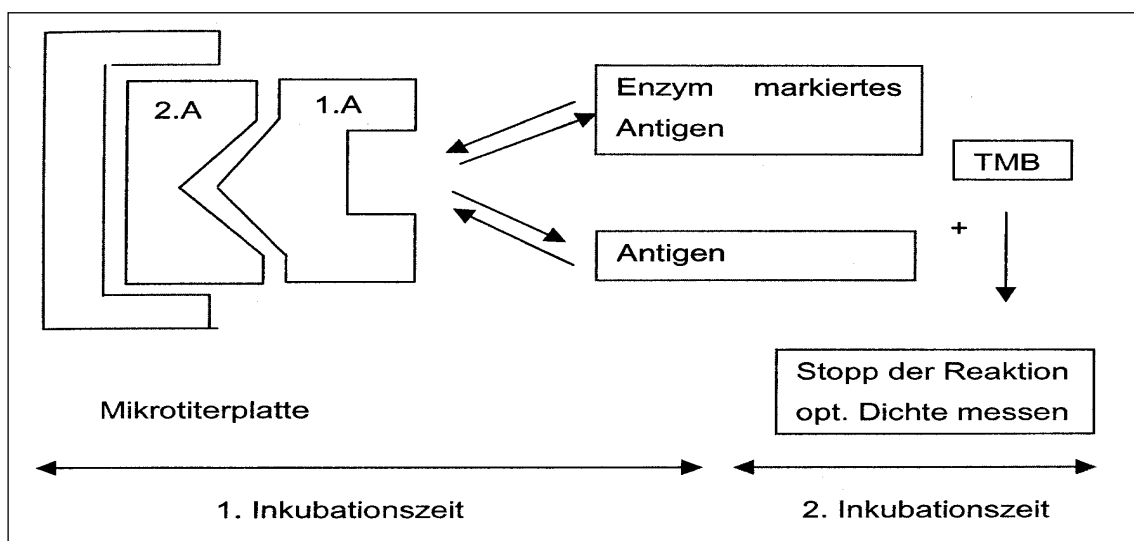


Abb.13: Prinzip des ELISA

Als Kontrollwerte dienen zum einen Ansätze, denen nur die chromogene Lösung TMB zugesetzt sind (Standard/B), weiterhin Ansätze ohne freies Antigen (Null Standard/0) sowie Ansätze, bei denen kein Antikörper an die feste Phase angeheftet ist (NSB). Zudem wird eine Standardkurve mit bekannten Konzentrationen des zu untersuchenden Antigens angefertigt.

II.2.4.1. Bestimmung des Prostaglandins E₂ aus dem Urin

Die Messungen wurden mit einem PGE₂-ELISA der Firma Amersham Biosciences durchgeführt und erfolgten nach dem Protokoll der Anleitung.

II.2.4.2. Standardkurve

Die Konzentrationen von PGE₂ für die Standardkurve betragen 320pg; 160pg; 80pg; 40pg; 20pg; 10pg; 5pg und 2,5pg/well.

II.2.4.3. Spezifität des Testes

Die polyklonalen Antikörper stellen natürliche Gemische der Antikörper dar, die im Zuge einer Immunantwort gegen verschiedene Determinanten eines Antigens von B-Lymphozyten bzw. Plasmazellen gebildet werden. Das am häufigsten zur Erzeugung dieser Antikörper genutzte Tier ist das Kaninchen. Aber auch von Spezies wie Schwein, Pferd und Ziege lassen sich geeignete Seren erzeugen. Jedes dieser Tiere besitzt jedoch eine Reihe von spontan entstandenen Antikörpern, die Störfaktoren bei den immunchemischen Reaktionen darstellen können. Der Nachteil der polyklonalen Antikörper besteht darin, dass sie ein breites Reaktionsspektrum besitzen, welches zu Kreuzreaktionen führen kann. (Abb.14)

Als Kreuzreaktion wird die Bindung eines Antikörpers an verschiedene Antigene bezeichnet, die ein gleiches oder ähnliches Epitop besitzen.

Analysierte Stoffe	Kreuzreaktionen in %
PGE ₁	25
PGF _{2a}	0,04
Arachidonsäure	<0,001

Abb.14: Mögliche Kreuzreaktionen des angewendeten Enzymimmunoassays für PGE₂

Die Empfindlichkeit des Testes beziffert der Hersteller mit 2pg/ml. Aus GC-MS basierenden Vergleichsmengen ist bekannt, dass nur geringe Mengen PGE_{2a} und vernachlässigbare Mengen PGE₁ renal ausgeschieden werden. Von daher besteht eine hohe Genauigkeit der ermittelten PGE₂-Werte.

II.2.4.4. Bestimmung des ADH - Arg⁸-Vasopressin - aus dem Mausplasma

Die Messungen wurden mit einem Arg⁸-Vasopressin ELISA der Firma R&D Systems durchgeführt und erfolgte nach dem Protokoll der Anleitung.

II.2.4.5. Standardkurve

Die Konzentrationen von Arg⁸-Vasopressin für die Standardkurve betragen 100pg; 40pg; 16pg; 6,4pg; 2,56pg; 1,024pg und 0,41pg/well.

II.2.4.6. Spezifität des Testes

Die Möglichkeit einer Kreuzreaktion folgender Substanzen wurde in einem Konzentrationsbereich von 1pg/ml bis 10000pg/ml ermittelt. Die Verdünnung der analysierten Stoffe erfolgte mit dem Assay Puffer ED1. (Abb.15)

Analysierte Stoffe	Kreuzreaktionen in %
LYS8-Vasopressin	7,3
Oxytocin	<0,001
Desmopressin	<0,001

Abb.15: Mögliche Kreuzreaktionen des angewendeten Enzymimmunoassays für Arg⁸-Vasopressin

Die Empfindlichkeit des Testes bezifferte der Hersteller mit 3,39pg/ml.

II.2.5. Die Proteinbestimmung

Für die Bestimmung der Proteine wurde die Sigma-Mikroprotein-Lösung verwendet. Diese Methode beruht auf der Bindung eines Farbstoffs und zeichnet sich durch eine hohe Empfindlichkeit und Genauigkeit aus. Sie basiert auf den unterschiedlichen Bindungsfähigkeiten der Proteine. Bei dem Sigma-Mikroprotein-PR-Verfahren wird die Verschiebung der Absorption, die auftritt wenn der Pyrogallol-Red-Molybdat-Komplex an basische Aminosäuregruppen der Proteinmoleküle bindet, gemessen. Die Zunahme der Absorption bei 600nm ist direkt proportional zur Proteinkonzentration in der Probe.

II.2.5.1. Die quantitative Bestimmung der Proteine im Urin

Für die Proteinbestimmung mit der Sigma-Mikroprotein-Lösung wurde eine unbeschichtete 96-well-Mikrotiterplatte verwendet. Die Festlegung des Messbereiches erfolgte anhand von Verdünnungsreihen. Er lag in diesem Versuch im Bereich der Konzentrationen der Standardkurve.

II.2.5.2. Herstellung einer Standardkurve

33mg BSA wurden in 1,65ml PBS gelöst und somit eine Lösung mit einer Proteinkonzentration von 20mg/ml hergestellt. Durch weiteres Verdünnen mit PBS entstanden Standardkonzentrationen mit folgenden Werten: 1,85; 1,25; 0,925; 0,625; 0,4625; 0,3125; 0,2313; 0,1563 und 0,1156mg/ml.

II.2.5.3. Durchführungsvorschrift

Entsprechend der dargestellten Durchführungsvorschrift wurden die Lösungen der Standards, des Leerwertes (MQ-Wasser) und der Proben in die Pippetiervertiefungen eingebracht.

Danach wurde in jedes well 200 μ l der Sigma-Mikroprotein-Lösung gegeben und die Platte bei Raumtemperatur für drei Minuten inkubiert. (Abb.16) Die Absorption wurde bei einer Wellenlänge von 600nm im Spektrometer gemessen und ausgewertet.

	Nullstandart (0)	Standard	Probe (P)
MQ H ₂ O	5	-	-
Standard	-	5	-
Probe	-	-	5
Mikroprotein-PR- Lösung	200	200	200

Abb.16: Art und Volumen (in μ l) der eingebrachten Substanzen

II.2.5.4. Pipettiervorschrift

Von den 96 zur Verfügung stehenden Pipetiervertiefungen werden 30 für die jeweils dreifach eingebrachten Lösungen der Standardkurve und den Leerwert benutzt. Die zu untersuchenden Proben wurden doppelt in die freien 66 wells eingebracht. (Abb.17)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	MQ H ₂ O	MQ H ₂ O	MQ H ₂ O	0,1563	0,1563	0,1563	P	P	P	P	P	P
B	1,85	1,85	1,85	0,1156	0,1156	0,1156	P	P	P	P	P	P
C	1,25	1,25	1,25	P	P	P	P	P	P	P	P	P
D	0,925	0,925	0,925	P	P	P	P	P	P	P	P	P
E	0,625	0,625	0,625	P	P	P	P	P	P	P	P	P
F	0,4625	0,4625	0,4625	P	P	P	P	P	P	P	P	P
G	0,3125	0,3125	0,3125	P	P	P	P	P	P	P	P	P
H	0,2313	0,2313	0,2313	P	P	P	P	P	P	P	P	P

Abb.17: Pipettivorschrift Proteinbestimmung

Positionierung der Lösungen für die Standardkurve mit absinkenden Proteinkonzentrationen von 1,85 bis 0,1156mg/ml

II.2.5.5. Spezifität des Tests

Störsubstanzen, die die Ergebnisse der Messungen laut Hersteller verändern können, sind z.B. größere Mengen anorganischen Phosphats, Ca²⁺, Mg²⁺, Kreatinin, Harnstoff, Glucose, Harnsäure, Zitrat (Natrium), Oxalat (Natrium) und Ascorbat (Natrium). Sie beeinflussen die Bestimmung des Gesamtproteins in einer Größenordnung von weniger als fünf %.

II.2.6. Die Elektrolytbestimmung aus dem Urin

Für die quantitative Bestimmung der Ionen Na⁺ und K⁺ aus den Mäuserinen kam der Elektrolytautomat EFOX5053 zur Anwendung. Die Messungen erfolgten auf dem Prinzip eines Emissionsflammenphotometers mit einer Lithium-Leitlinie.

Die Flammenphotometrie ist ein Relativmessverfahren, das bedeutet, dass das Messsignal einer unbekannt Probe mit dem Signal einer bekannten Standardlösung verglichen wird. Hieraus kann die Probenkonzentration berechnet werden. Die Standardkonzentrationen für Urin bei Na⁺ betragen 143,5mmol/l und für K⁺ 100,0mmol/l.

Da die Konzentrationen der zu messenden Ionen für die direkte Bestimmung zu hoch sind und die Matrix die Bestimmung stören würde, werden die Proben automatisch im Verhältnis 1:50 verdünnt. EFOX5053 arbeitet nach dem Leitlinienprinzip. Hierbei werden alle Proben mit einer Verdünnungslösung vermischt, die Lithium als Leitelement enthält. Alle Veränderungen der Zerstäubung, des Luft- oder Gasdruckes wirken sich annähernd gleich auf das Messelement (Na^+ , K^+) und auf das Leitelement (Li) aus.

Die Bestimmung der Elektrolyte erfolgte freundlicherweise durch Prof. Kleine, Philipps-Universität Marburg.

II.2.7. Die Reninbestimmung im Plasma

Die Bestimmung des Renins im Plasma erfolgte nach dem Prinzip des Ultramicroassays.

Aus einer Plasmaprobe wurden fünf Serienverdünnungen hergestellt. Die Messungen wurden in Form einer Doppelbestimmung durchgeführt.

Wenn eine Linearität von mindestens drei Serienverdünnungen vorlag, wurde das Ergebnis verwendet. Die Reninkonzentration ist in Goldblatt units (GU) angegeben und wurde mit den Reninstandards des National Institute for Biological Standards and Control (Hertfordshire, UK) verglichen.

Die Bestimmung des Renins im Plasma erfolgte freundlicherweise durch Boye Jensen, Abteilung für Physiologie und Pharmakologie, Universität von Süd-Dänemark in Odense.

II.2.8. Die Bestimmung des Furosemids im Urin

Die Bestimmung des Furosemids erfolgte mit Hilfe der HPCL-Methode (high-performance-liquid-chemistry) [Radeck et al, 1989].

Die Durchführung erfolgte freundlicherweise durch Bernhard Watzer, Kinderklinik, Philipps-Universität Marburg.

II.2.9. Die Herstellung der Furosemidlösung

Die Furosemidlösung sollte in einer Konzentration von 1mg/ml vorliegen.

Dazu wurden 5g Furosemidpulver in 50ml Wasser gegeben, 3,3ml 5M NaOH hinzugegeben und unter Wärmezufuhr (70°C) und Rühren auf dem beheizbaren Magnetrührer MR 2001 gelöst. Daraufhin wurde der pH-Wert durch Zugabe von 1,25ml 1M HCl auf 8,0-8,5 eingestellt. Mit lauwarmem Leitungswasser ist die Lösung auf 5Liter verdünnt worden.

II.3. Statistik

Die statistischen Analysen wurden im Programm PRISM durchgeführt. Die Versuchsgruppen wurden mittels des Schapiro-Wilk-Test auf ihre Normalverteilung überprüft. Bei Vorhandensein nicht normal verteilter Gruppen wurde generell das nicht-parametrische Verfahren One-way-Anova verwendet. Hierbei wurde der Kruskal-Wallis-Test in Verbindung mit dem Post-Test-Verfahren eingesetzt.

Die Darstellung der Daten erfolgte mit \pm SEM. P-Werte $< 0,05$ werden als signifikant angegeben.

III. Ergebnisse

In diesen Versuchen wurde das HPS/aBS am Tiermodell der Maus durch das Schleifendiuretikum Furosemid simuliert und die folgenden Parameter genauer untersucht:

- Furosemid im Urin ($\mu\text{g/ml}$)
- Gewichtsbilanz (g/d)
- PGE_2 im Urin (ng/24h)
- Diurese (ml/kg/24h)
- Elektrolyte Na^+ und K^+ im Urin ($\mu\text{mol/24h}$)
- Trinkvolumen (ml/24h)
- Renin im Plasma (mGU/ml)
- ADH im Plasma (ng/24h)
- Protein im Urin (mg/ml)

III.1. Furosemid im Urin ($\mu\text{g/ml}$)

Durch die Bestimmung des Schleifendiuretikums Furosemid im Urin konnte der Nachweis erbracht werden, dass diese Substanz von den Mäusen über die Tränke aufgenommen wurde und in wirksamen Konzentrationen im Tubuluslumen vorlag.

In Abbildung 18 ist die renale Furosemidausscheidung der verschiedenen Versuchsgruppen aufgezeigt. Die Furosemidkonzentrationen wurden nach dem dritten Tag der Verabreichung bestimmt. Die Ausscheidungsmenge ist anhand der einzelnen Versuchsgruppen dargestellt und beträgt zwischen $350\mu\text{g/ml}$ und $500\mu\text{g/ml}$ Urin. Wenn auch bei COX1^{-/-} und COX2^{-/-} eine Tendenz zur geringeren Furosemidausscheidung zu beobachten ist, so ist diese nicht signifikant verschieden im Vergleich zu den genetisch unveränderten Wildtyp-Tieren.

Im Urin der Tiere, die aqua ad libidum tranken, konnten keine Furosemidkonzentrationen ermittelt werden.

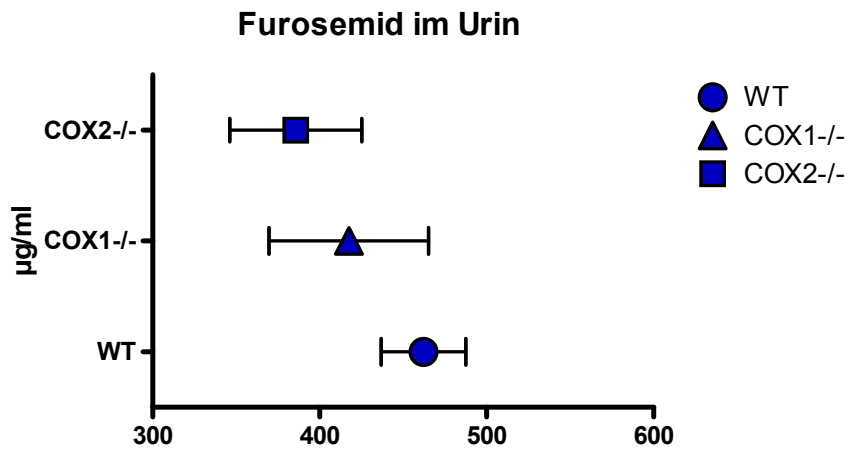


Abb.18: Furosemidausscheidung im Urin in $\mu\text{g/ml}$ bei behandelten Wildtyp-Tieren, COX1-/- und COX2-/-Mäusen

III.2. Gewichtsbilanz (g/d)

Das Gewicht der Tiere wurde täglich vor der Säuberung der Käfige ermittelt.

Anhand der Grafiken lässt sich erkennen, dass die Tiere fast aller Versuchsgruppen einen Gewichtsverlust bis maximal 0,75g/d aufweisen.

Auffällig ist der hohe Verlust noch unter Basalbedingungen, als die Tiere nur aqua ad libidum über die Tränke erhielten. (Abb.19)

Eine leichte Zunahme an Gewicht während der Gabe des Inhibitors SC236 war sowohl bei den Wildtyp-Tieren, als auch bei COX1-/- zu erkennen. Dennoch sind die Werte als relativ stabil zu bezeichnen und zeigen keinen Hinweis auf eine starke körperliche Beeinträchtigung der Tiere, die sich unter anderem durch einen ausgeprägten Gewichtsverlust auszeichnen würde. (Abb.20)

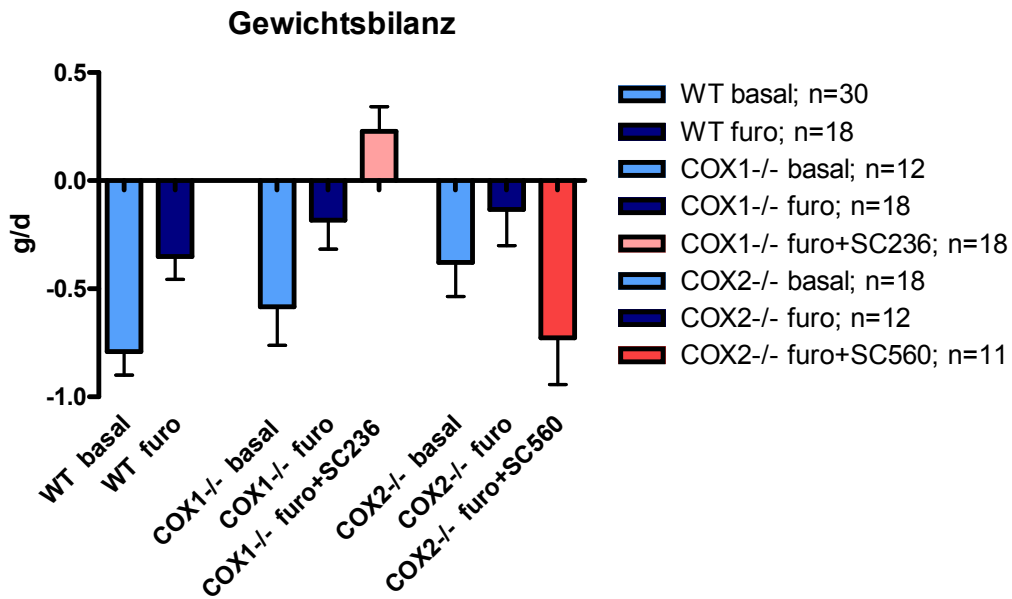


Abb.19: Gewichtsbilanz in g/d bei unbehandelten und behandelten Wildtyp-Tieren, COX1-/- und COX2-/-Mäusen

Es konnten keine Signifikanzen ermittelt werden.

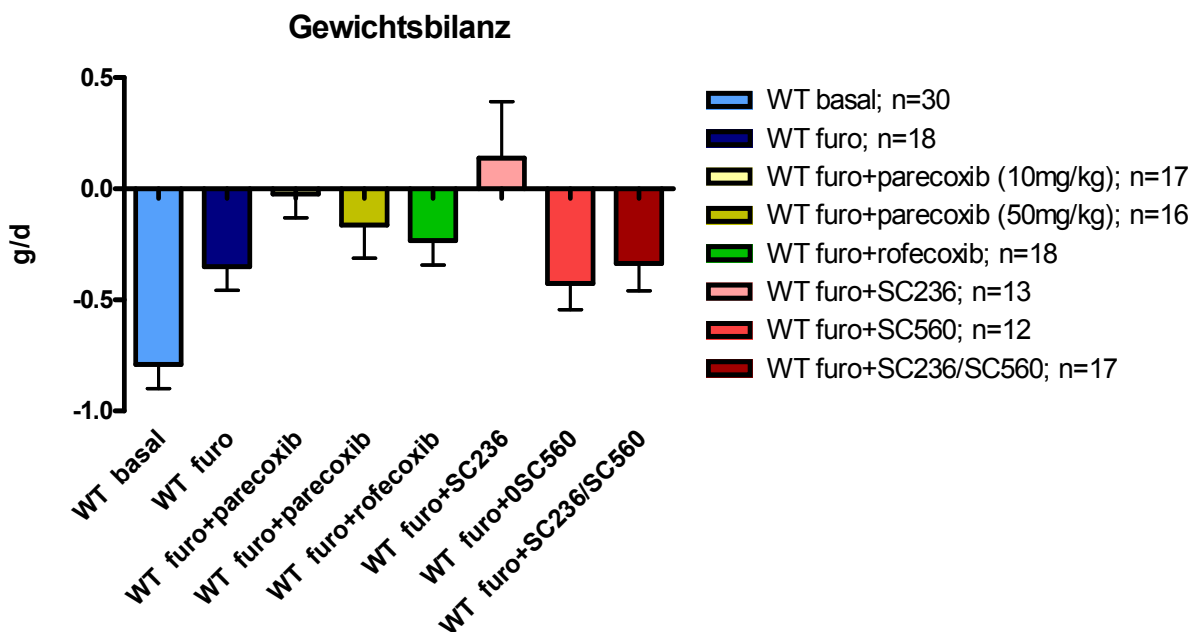


Abb.20: Gewichtsbilanz in g/d bei unbehandelten und behandelten Wildtyp-Tieren;

Es konnten keine Signifikanzen ermittelt werden.

III.3. PGE₂ im Urin (ng/24h)

Das Prostaglandin E₂ wurde immunometrisch im Urin der Tiere bestimmt.

Die basalen PGE₂-Werte der Wildtyp-Mäuse betragen 2,9ng/24h und waren damit deutlich niedriger, als bei den Vergleichsgruppen. Die Aufnahme von Furosemid über die Tränke bewirkte einen signifikanten Anstieg um das Vierfache auf 11,6ng/24h.

Nach der Verabreichung des SC236, des SC560, des Parecoxibs und des Rofecoxibs konnte immer ein Abfall der PGE₂-Werte beobachtet werden. Signifikant war dieser Effekt bei der Verabreichung des Rofecoxibs, des SC560, des SC236 und bei der Kombination von SC560 und SC236.

Der basale PGE₂- Wert wurde nicht erreicht. (Abb.21)

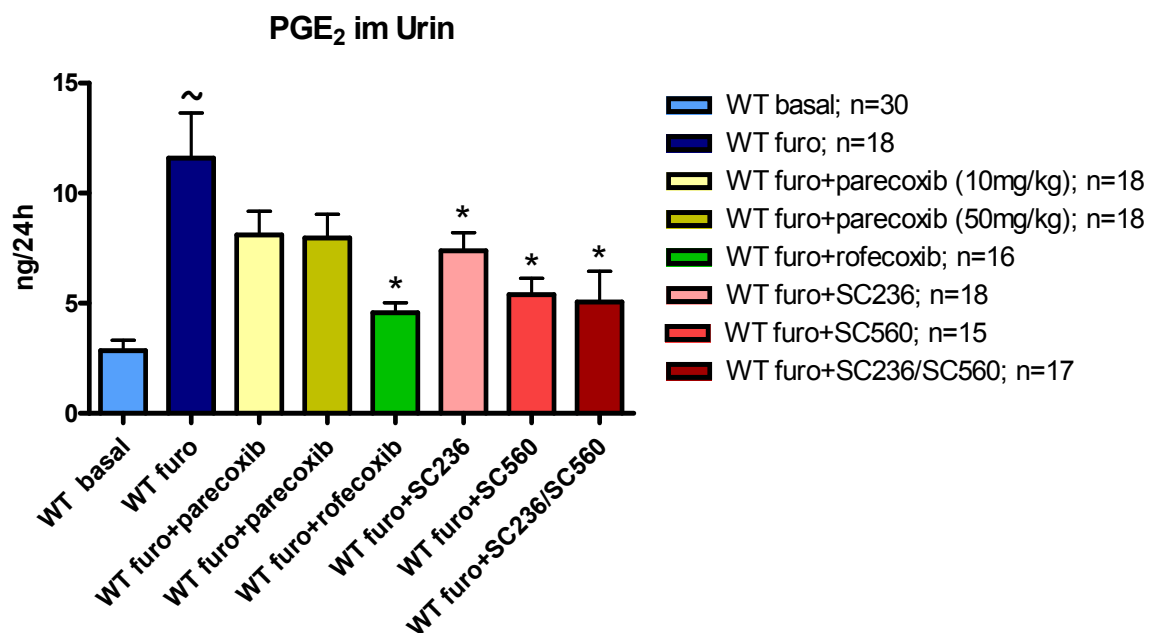


Abb.21: PGE₂-Werte im Urin in ng/24h bei unbehandelten und behandelten Wildtyp-Tieren; WT basal vs. WT furo P<0,05 (~); WT furo vs. WT furo+rofecoxib P<0,05 (*); WT furo vs. WT furo+SC236 P<0,05 (*); WT furo vs. WT furo+SC560 P<0,05 (*); WT furo vs. WT furo+SC236 und SC560 P<0,05 (*)

Die Knock-out-Tiere zeigten bereits basal deutlich höhere PGE₂-Werte im Vergleich zu den Wildtyp-Tieren. Bei COX1^{-/-} konnte ein signifikanter Anstieg unter Furosemid von 10,4ng/24h auf 28,7ng/24h festgestellt werden. Unter SC236 fiel die Ausscheidung wieder auf 21,9ng/24h ab.

Bei COX2^{-/-} lag unter Basalbedingungen die PGE₂-Ausscheidung im Urin bei 9,1ng/24h, die nach Gabe des Furosemids nicht - wie bei den anderen Versuchsgruppen - stieg, sondern gering sank (7,9ng/24h). Durch den Einsatz des selektiven COX1-Hemmers SC560 fiel die Ausschüttung des PGE₂ noch einmal signifikant auf 0,7ng/24h herab. (Abb.22) Dies ist eine solch geringe Ausscheidung, wie sie bei keiner anderen Gruppe, unabhängig von der Art des Hemmers, beobachtet werden konnte.

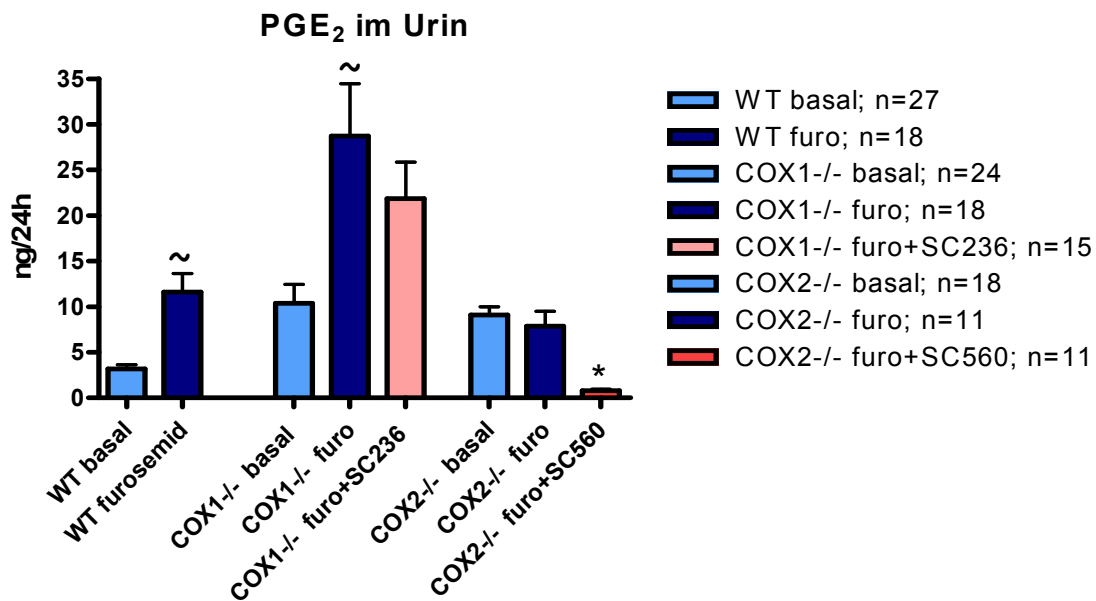


Abb.22: PGE₂-Werte im Urin in ng/24h bei unbehandelten und behandelten Wildtyp-Tieren, COX1^{-/-}-und COX2^{-/-}-Mäusen; WT basal vs. WT furo P<0,05 (~); COX1^{-/-} basal vs. COX1^{-/-} furo P<0,05 (~); COX2^{-/-} furo vs. COX2^{-/-} furo+SC560 P<0,05 (*)

III.4. Diurese (mg/kg/24h)

Ein signifikanter Anstieg der Diurese unter Furosemid im Vergleich zu den Basalwerten, als die Tiere aqua ad libidum über die Tränke erhielten, konnte bei jeder Versuchsgruppe gezeigt werden. Die Basaldiuresewerte waren bei den drei Versuchsgruppen mit ca. 50ml/kg/24h vergleichbar, jedoch der war Anstieg unter Furosemid unterschiedlich stark ausgeprägt, wie es in Abbildung 24 dargestellt ist.

Sie stiegen bei den Wildtyp-Tieren um fast das Sechsfache auf 287,6ml/kg/24h an. Bei COX1-/- erhöhten sich die Basalwerte um mehr als das Sechsfache auf 324,0ml/kg/24h, hingegen bei COX2-/- nur um etwa das Zweieinhalbfache auf 124,0ml/kg/24h. Die Wildtyp-Tiere erhielten als einzige Versuchsgruppe neben dem hoch selektiven COX1-Hemmer SC560 und dem ebenfalls hoch selektiven COX2-Hemmer SC236 auch noch die Wirkstoffe Parecoxib in Form von Dynastat[®] sowie Rofecoxib in Form von Vioxx[®], wie aus der Abbildung 23 ersichtlich ist.

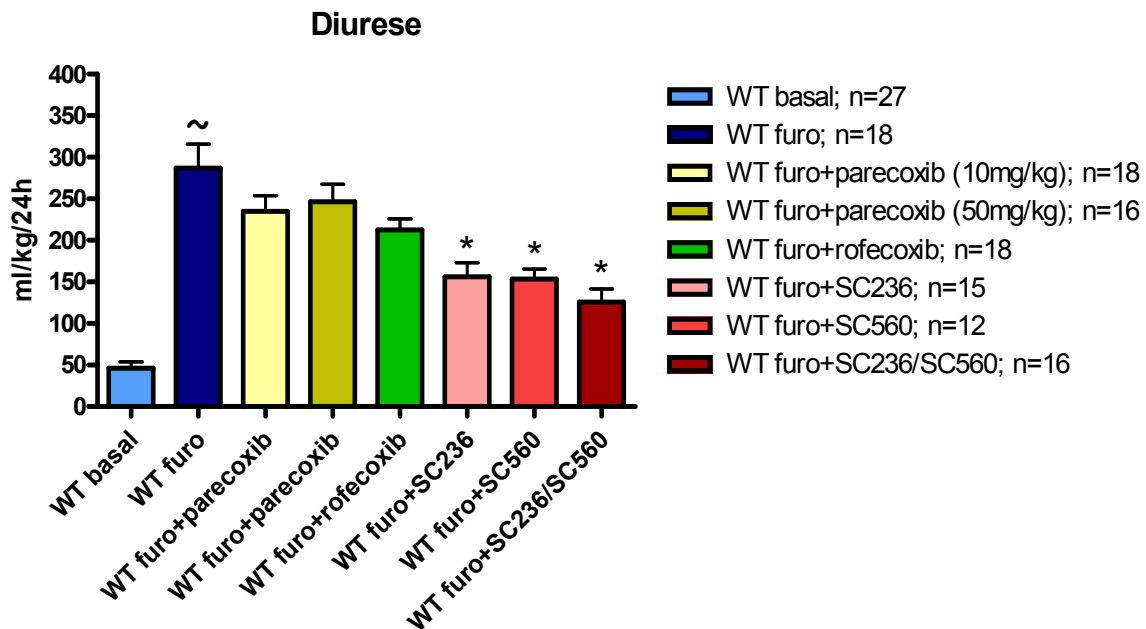


Abb.23: Diurese in ml/kg/24h bei unbehandelten und behandelten Wildtyp-Tieren;
 WT basal vs. WT furo $P < 0,05$ (~); WT furo vs. WT furo+SC236 $P < 0,05$ (*); WT furo vs.
 WT furo+SC560 $P < 0,05$ (*); WT furo vs. WT furo+SC236 und SC560 $P < 0,05$ (*)

Die Gabe von Parecoxib zeigte sowohl in der Dosis 10mg/kg als auch in der Dosis 50mg/kg nur eine sehr geringe Änderung der Diurese (235,0ml/kg/24h, 246,5ml/kg/24h). Auch Rofecoxib wirkte sich nicht wesentlich deutlicher auf diese aus (212,4ml/kg/24h). Die Verabreichung der hoch selektiven COX1- und COX2-Hemmer SC560 und SC236 senkte die Diurese bei den Wildtyp-Tieren um 46 % (156,2ml/kg/24h, 153,3ml/kg/24h). Durch die gleichzeitige Applikation beider Inhibitoren ist eine noch stärkere Reduzierung der Diurese um 56% auf 125,8ml/kg/24h zu beobachten.

Trotz des signifikanten Anstiegs nach Furosemidgabe wurde bei COX1-/- kein ebenso deutlicher Rückgang nach der Gabe des SC236 festgestellt (227,0ml/kg/24h). Bei den COX2-/- war dieser nach Verabreichung des SC560 wesentlich stärker -mit 48 % - ausgeprägt (65,3ml/kg/24h).

Die Basaldiuresewerte konnten bei keiner der Versuchsgruppen wieder erreicht werden. Ein Rückgang von 56 % bei den Wildtyp-Tieren während sie Furosemid über die Tränke und die Kombination von SC560 und SC236 erhielten, war das erreichbare Maximum.

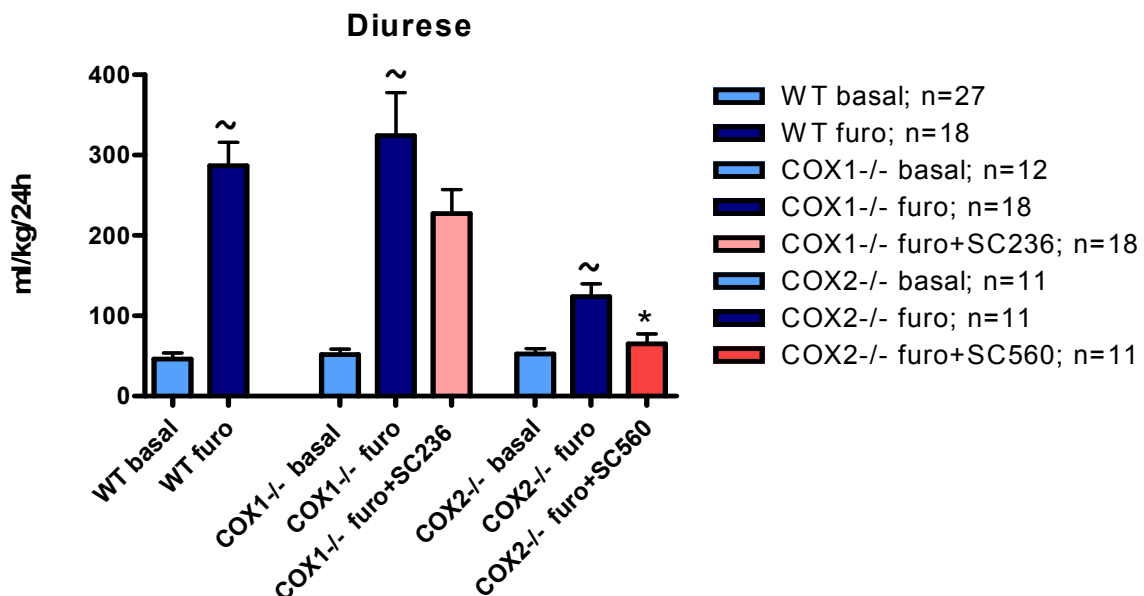


Abb.24: Diurese in ml/kg/24h bei unbehandelten und behandelten Wildtyp-Tieren, COX1-/- und COX2-/- Mäusen; WT basal vs. WT furo $P < 0,05$ (~); COX1-/- basal vs. COX1-/- furo $P < 0,05$ (~); COX2-/- basal vs. COX2-/- furo $P < 0,05$ (~); COX2-/- furo vs. COX2-/- furo+SC560 $P < 0,05$ (*)

III.5. Elektrolyte Na⁺ und K⁺ im Urin (μmol/24h)

Für die Bestimmung der Elektrolyte Na⁺ und K⁺ im Urin wurden Proben von den Versuchsgruppen unter Basalbedingungen, bei alleiniger Verabreichung des Furosemids und bei Verabreichung des Furosemids in der Kombination mit den hoch selektiven Hemmern SC236 und SC560, verwendet.

Als Natriumionenkonzentration bei den Wildtyp-Tieren wurde basal ein Wert von 114,4 μmol/24h ermittelt. Unter Furosemid konnte ein Anstieg dieser Konzentration um etwa das Zweieinhalbfache verzeichnet werden (273,5μmol/24h). Durch die Verabreichung der Hemmer SC236 und SC560 wurde diese signifikant auf 140,6μmol/24h bzw. 165,1μmol/24h gesenkt. Die Kombination von beiden Hemmern bewirkte, dass die Natriumausscheidung sogar noch weiter, gering unter den Basalwert, auf 97,2μmol/24h abfiel. (Abb.25)

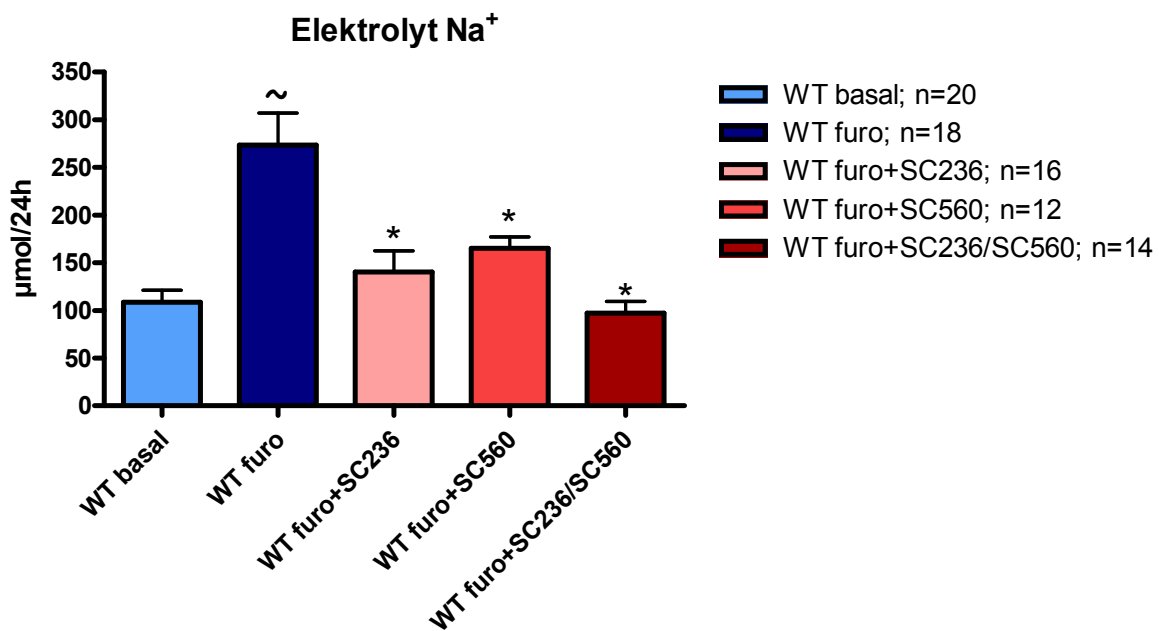


Abb.25: Na⁺ im Urin in μmol/24h bei unbehandelten und behandelten Wildtyp- Tieren;
WT basal vs. WT furo P<0,05 (~); WT furo vs. WT furo+SC236 P<0,05 (*); WT furo vs.
WT furo+SC560 P<0,05 (*); WT furo vs. WT furo+SC236 und SC560 P<0,05 (*)

Wie aus der Abbildung 26 ersichtlich ist, stieg bei COX1-/- die Natriumausscheidung im Urin unter Furosemid um fast das Sechsfache von 72,6 $\mu\text{mol}/24\text{h}$ auf 415,5 $\mu\text{mol}/24\text{h}$ an. Keine andere Versuchsgruppe zeigte einen so starken Anstieg und eine derart hohe Konzentration im Urin. Die Gabe des Hemmers SC236 ließ sie um 44 % auf 231,6 $\mu\text{mol}/24\text{h}$ sinken.

Die Konzentration dieses Elektrolytes bei COX2-/- unter basalen Bedingungen (50,5 $\mu\text{mol}/24\text{h}$) ist im Vergleich zu den Wildtyp-Tieren um 56 % und im Vergleich zu COX1-/- um 31 % niedriger. Durch die Furosemidgabe wurde die Konzentration um das Zweifache erhöht (99,8 $\mu\text{mol}/24\text{h}$). Das SC560 bewirkte, ähnlich wie bei den Wildtyp-Tieren die Kombination von SC236 und SC560, einen Abfall unter den Basalwert auf 44,9 $\mu\text{mol}/24\text{h}$. (Abb. 26)

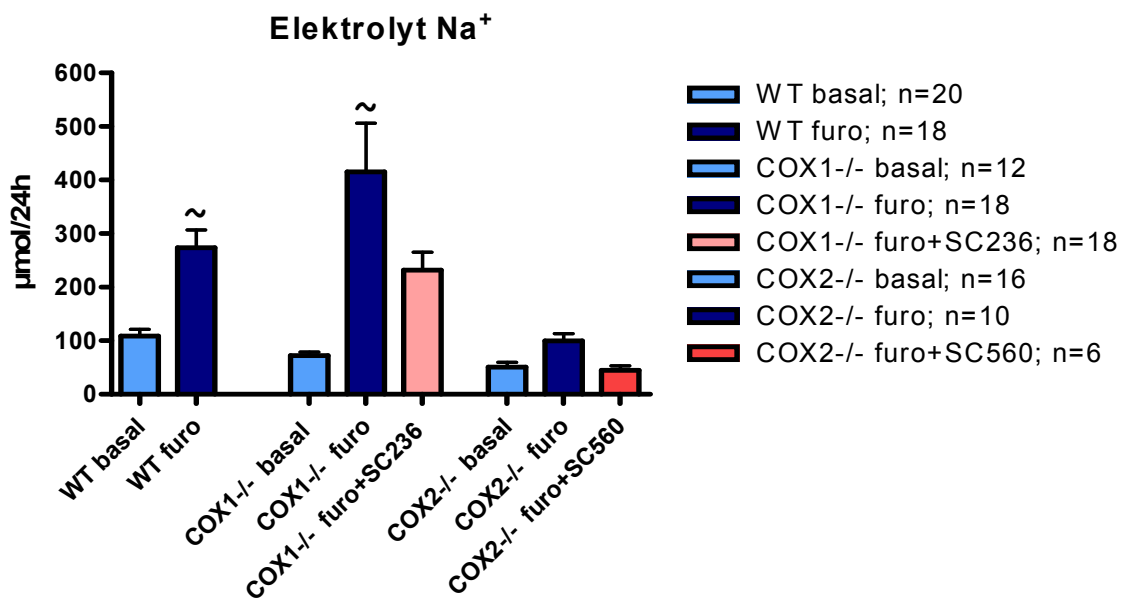


Abb.26: Na⁺ im Urin in $\mu\text{mol}/24\text{h}$ bei unbehandelten und behandelten Wildtyp-Tieren, COX1-/- und COX2-/-Mäusen; WT basal vs. WT furo $P < 0,05$ (~); COX1-/- basal vs. COX1-/- furo $P < 0,05$ (~)

Die Konzentration des Kaliums im Urin unter basalen Bedingungen bei den Wildtyp-Tieren betrug 247,9 $\mu\text{mol}/24\text{h}$. Unter Furosemid stieg diese gering auf 279,3 $\mu\text{mol}/24\text{h}$ an.

Durch die Einzelgabe der selektiven Hemmer SC236 und SC560 und die Kombination von Beiden wurde ein Trend zur geringeren Ausscheidung des Kaliums sichtbar, der jedoch keinesfalls signifikant war. (Abb.27)

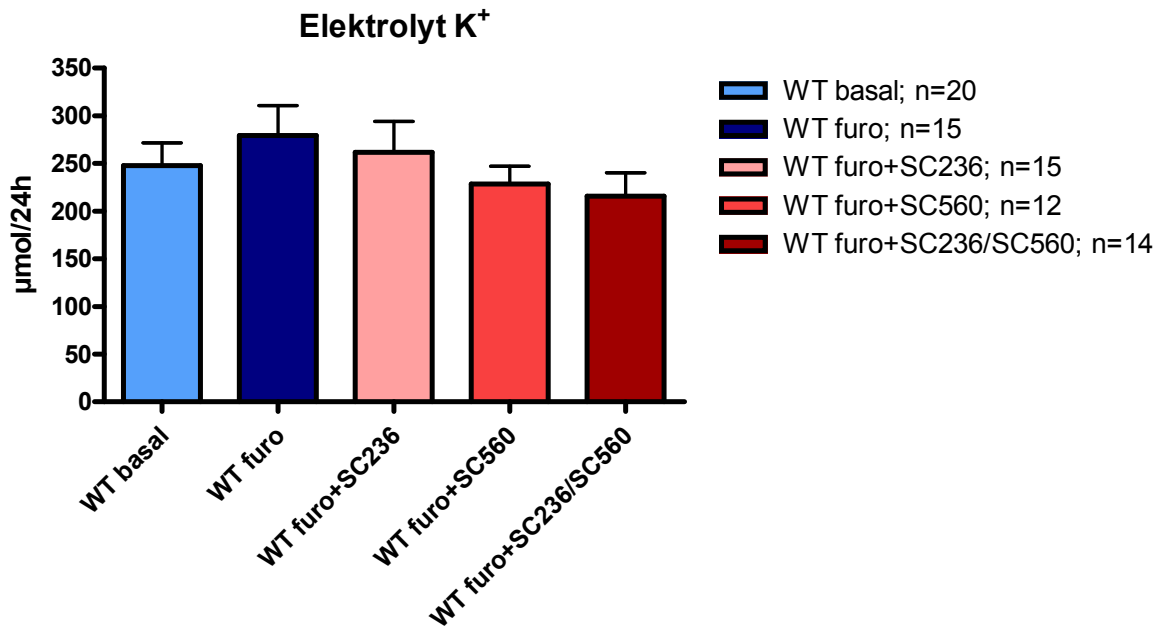


Abb.27: K⁺ im Urin in µmol/24h bei unbehandelten und behandelten Wildtyp-Tieren, Es konnten keine signifikanten Unterschiede ermittelt werden.

Das Elektrolyt K⁺ wurde in einer Konzentration von 219,5µmol/24h im Urin der COX1^{-/-} unter basalen Bedingungen gemessen. Während der Verabreichung des Furosemids stieg die Ausscheidung um mehr als das Zweifache auf 467,2µmol/24h. Auch bei diesem Elektrolyt erreichten die COX1^{-/-} Konzentrationen, wie sie in keiner anderen Versuchsgruppe in ihrem Anstieg und ihrer Ausprägtheit zu finden waren.

Die COX2^{-/-} zeigten im Gegensatz zu den anderen Gruppen - ähnlich wie beim Natrium - geringere Basalwerte (107,4µmol/24h). Im Vergleich zu den Wildtyp-Tieren waren sie um 56 % herabgesetzt, im Vergleich zu COX1^{-/-} um 52 %. Unter Furosemid stieg die Konzentration von Natrium an, jedoch lag dieser Wert noch immer unter den Basalkonzentrationen der anderen Versuchsgruppen.

Die Verabreichung des SC560 ließ die Konzentration der Ionen im Urin deutlich unter den Basalwert auf 84,5 μ mol/24h fallen.

Auch hier sind Parallelen zum Natrium zu erkennen. (Abb. 28)

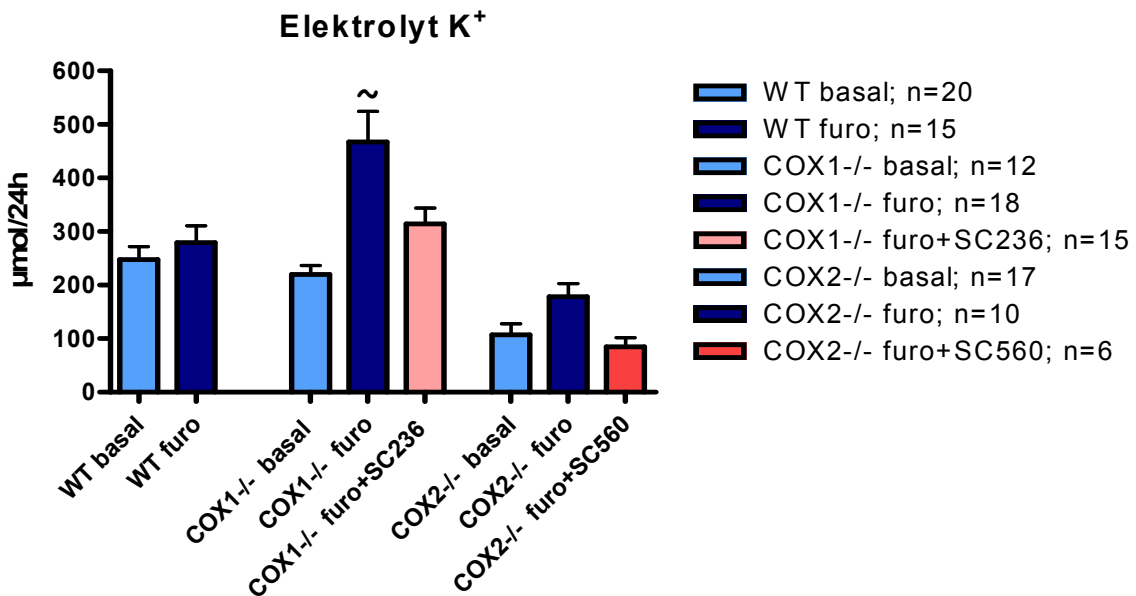


Abb.28: K⁺ im Urin in μ mol/24h bei unbehandelten und behandelten Wildtyp-Tieren, COX1-/- und COX2-/-Mäusen; COX1-/- basal vs. COX1-/- furo P<0,05 (~)

III.6. Trinkvolumen (ml/24h)

Parallel zum Anstieg der Diurese war auch eine Veränderung im Trinkverhalten der Tiere feststellbar.

Das Trinkvolumen aller drei untersuchten Gruppen lag, als sie aqua ad libidum erhielten, bei ca. 5,5ml (\pm 1ml) pro Tag und war somit nur gering verschieden. Die Veränderungen der Trinkgewohnheiten nach Furosemidgabe waren jedoch sehr auffällig. Bei den Wildtyp-Tieren stieg die bestimmte Trinkmenge signifikant um 42 % an (11,3ml/24h). Bei COX1-/- war sogar ein Anstieg von 54 % zu beobachten (13,5ml/24h). Im Gegensatz dazu zeigten die COX2-/- nur eine Veränderung von 4,8ml auf 7,1ml. Dieser Anstieg betrug damit nur 38 %.

Durch die Verabreichung des Hemmers SC236 bei COX1-/- kam es nur zu einer sehr geringen Veränderung.

Bei COX2-/- zeigte die Gabe des Hemmers SC560 einen deutlicheren Effekt. Hier fiel die Trinkmenge auf 5,4ml/24h ab und näherte sich damit dem Basalwert fast wieder an. (Abb.29)

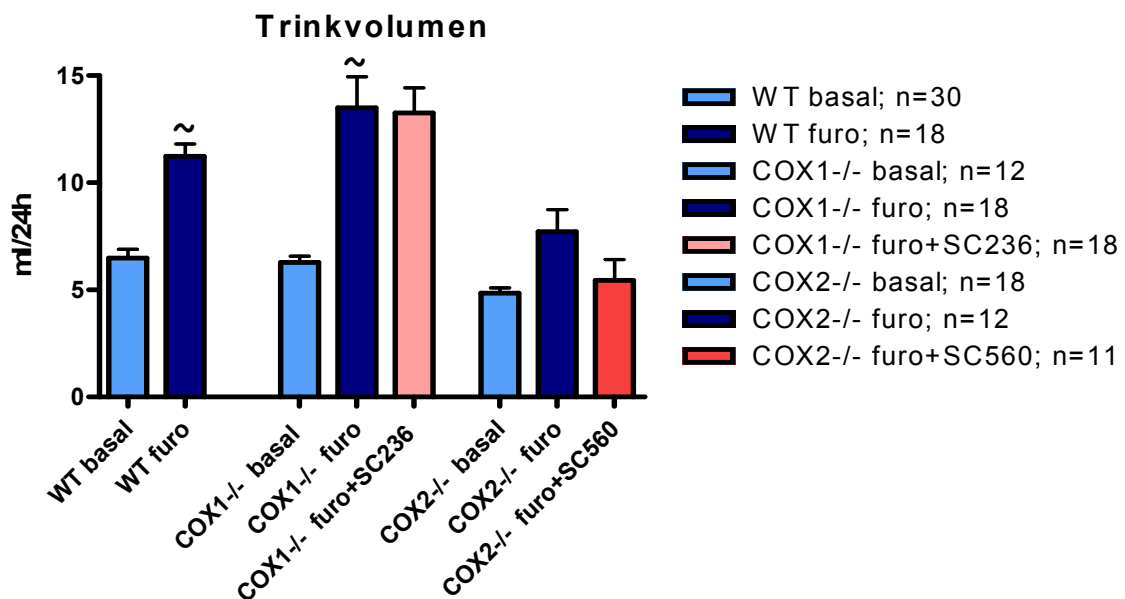


Abb.29: Trinkvolumen in ml/24h bei unbehandelten und behandelten Wildtyp-Tieren, COX1-/- und COX2-/-Mäusen; WT basal vs. WT furo $P < 0,05$ (~); COX1-/- basal vs. COX1-/- furo $P < 0,05$ (~)

Ein Abfall der Trinkmenge bei den Wildtyp-Tieren nach der Medikamentengabe und der Verabreichung der selektiven Hemmer konnte gezeigt werden. Der Wirkstoff Parecoxib in der Konzentration 10mg/kg wies nur eine geringe Verminderung -0,5ml/24h- im Gegensatz zur alleinigen Furosemidgabe auf. Die Erhöhung der Konzentration auf 50mg/ml bewirkte einen Rückgang um 1,4ml/24h. Die Verabreichung von Rofecoxib, des SC236 und des SC560 zeigte signifikante Unterschiede im Vergleich zur Behandlung ausschließlich mit Furosemid. Die Trinkmenge lag bei diesen eingesetzten Substanzen bei 8,3-8,7ml/24h.

Durch die gleichzeitige Gabe des SC236 und des SC560 konnte ein Rückgang auf 6,8ml/24h erreicht werden; das entspricht einem Rückgang um 40 % und somit einem Trinkvolumen nahe dem Basalwert. (Abb.30)

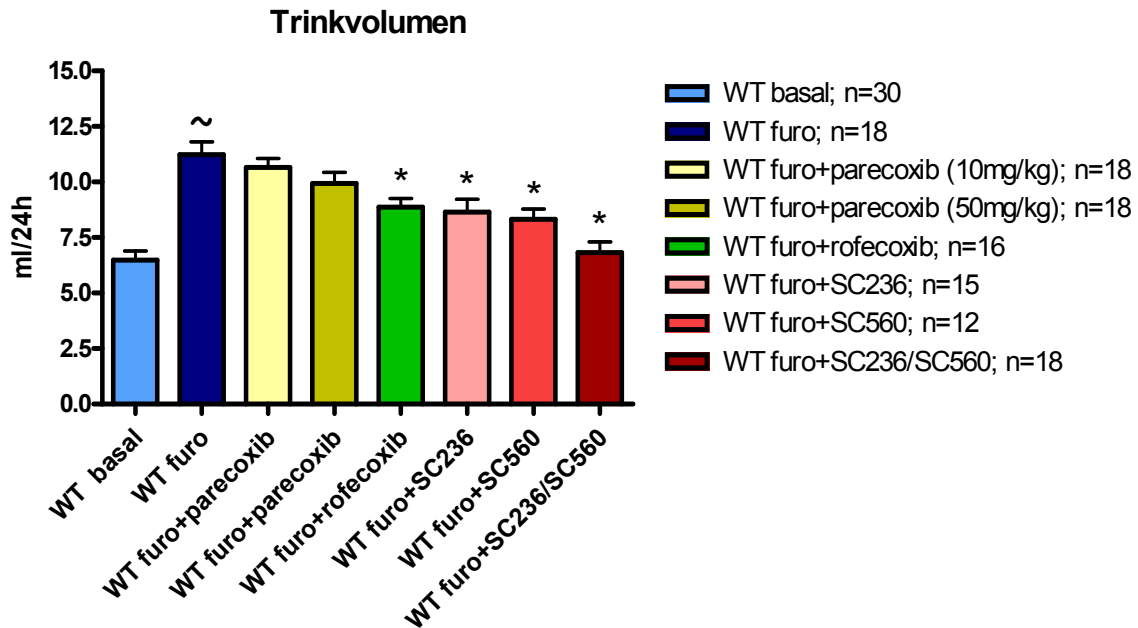


Abb.30: Trinkvolumen in ml/24h bei unbehandelten und behandelten Wildtyp-Tieren; WT basal vs. WT furo $P < 0,05$ (~); WT furo vs. WT furo+rofecoxib $P < 0,05$ (*); WT furo vs. WT furo+SC236 $P < 0,05$ (*); WT furo vs. WT furo+SC560 $P < 0,05$ (*), WT furo vs. WT furo+SC236 und SC560 $P < 0,05$ (*)

III.7. Renin im Plasma (mGU/ml)

Das Renin wurde im Plasma der Tiere bestimmt, welches nach dem dritten Tag der Verabreichungen gewonnen wurde.

Wie in Abbildung 31 dargestellt, betragen die basalen Reninwerte der Wildtyp-Tiere 29,9mGU/ml und sind damit im Vergleich zu den anderen Gruppen deutlich höher. Der Anstieg nach der Furosemidgabe ist signifikant und beläuft sich auf ca. 250 % (74,3mGU/ml). Durch den selektiven COX2-Hemmer SC236 gelang es die Reninkonzentration im Plasma deutlich zu senken und wieder in die Nähe des Basalwertes zu bringen.

Die Verabreichung des selektiven COX1-Hemmers SC560 senkte die Ausschüttung leicht, die Kombination von SC236 und SC560 senkte sie deutlicher, jedoch nicht signifikant.

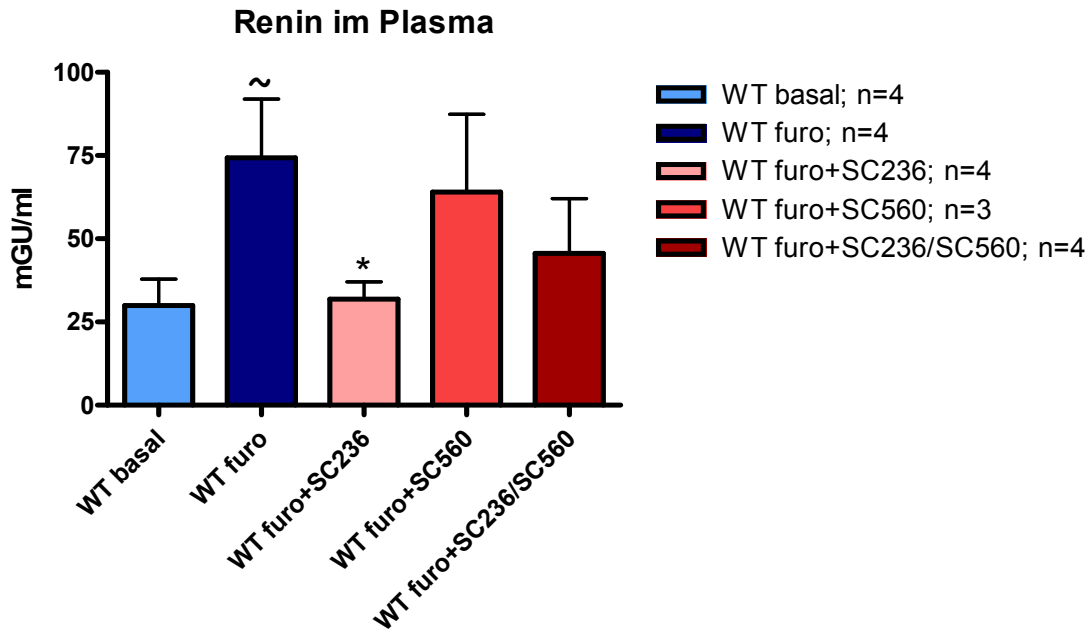


Abb.31: Renin im Plasma in mGU/ml bei unbehandelten und behandelten Wildtyp- Tieren;
WT basal vs. WT furo $P < 0,05$ (~); WT furo vs. WT furo+SC236 $P < 0,05$ (*)

Bei COX1-/- beträgt die basale Reninkonzentration im Plasma 19,5mGU/ml. Sie stieg auch bei dieser Gruppe nach Gabe des Furosemids in der Tränke signifikant um das Fünffache an (100,4mGU/ml). Ebenso wie bei den Wildtyp-Mäusen wurde durch den Einsatz des SC236 die Reninkonzentration deutlich - auf 47,0mGU/ml - gesenkt.

Die COX2-/- hatten mit 1,61mGU/ml auffallend kleine Basalwerte. Eine Steigerung um das Zweieinhalbfache unter Furosemid auf 4,08mGU/ml war zu beobachten, dies sind jedoch Werte, die deutlich unter denen der anderen Versuchsgruppen lagen.

Nach der Injektion des selektiven COX1-Hemmers SC560 unter Furosemid wurde eine Steigerung um das 11-fache auf 44,2mGU/ml festgestellt.

Dieser Wert lag jetzt in Bereichen, ähnlich den anderen Versuchsgruppen unter den selektiven Hemmern. (Abb.32)

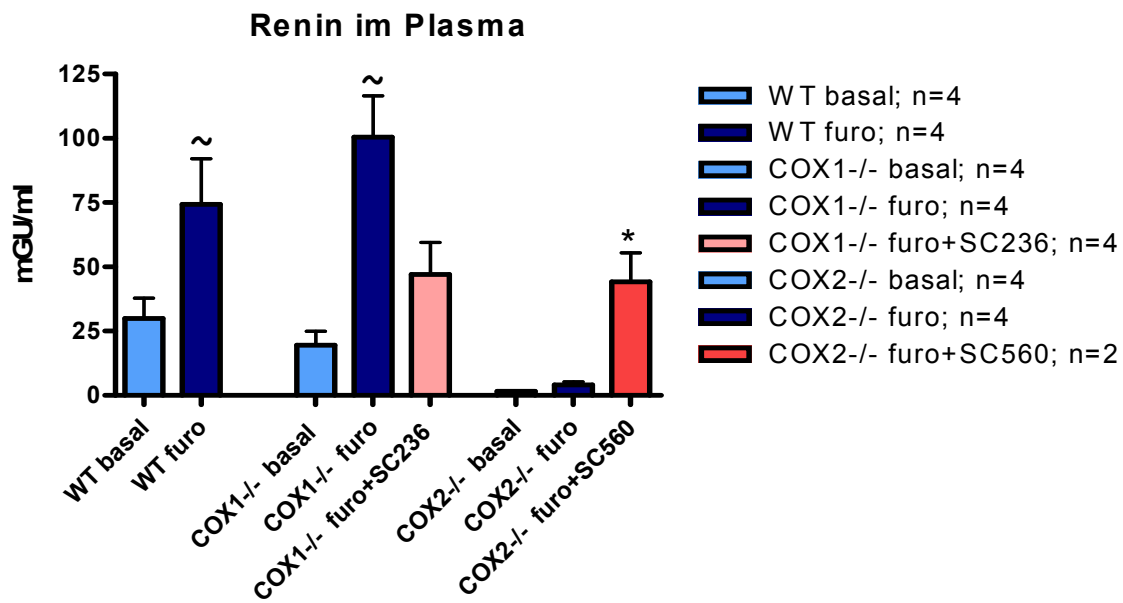


Abb.32: Renin im Plasma in mGU/ml bei unbehandelten und behandelten Wildtyp-Tieren, COX1-/- und COX2-/-Mäusen; WT basal vs. WT furo $P < 0,05$ (~); COX1-/- basal vs. COX1-/- furo $P < 0,05$ (~); COX2-/- furo vs. COX2-/- furo+SC560 $P < 0,05$ (*)

III.8. ADH im Plasma (ng/ml)

Das Anti-Diuretische-Hormon (ADH) wurde ebenfalls im Plasma, welches nach dem dritten Tag der Verabreichung gewonnen wurde, bestimmt.

Die Wildtyp-Tiere und die COX1-/- wiesen unter Basalbedingungen ähnliche ADH-Konzentrationen im Bereich von 0,7 - 0,9ng/ml auf. Bei COX2-/- war die ADH-Konzentration unter den gleichen Bedingungen um ein Vielfaches - auf 4,5ng/ml erhöht- vorgefunden worden.

Die Verabreichung des Furosemids bewirkte bei den Wildtyp-Tieren einen geringen Abfall des ADH.

Das SC236, das SC560 und die Kombination der beiden Hemmer zeigte bei diesen Tieren keine signifikante Veränderung im Vergleich zum Basalwert. (Abb.33)

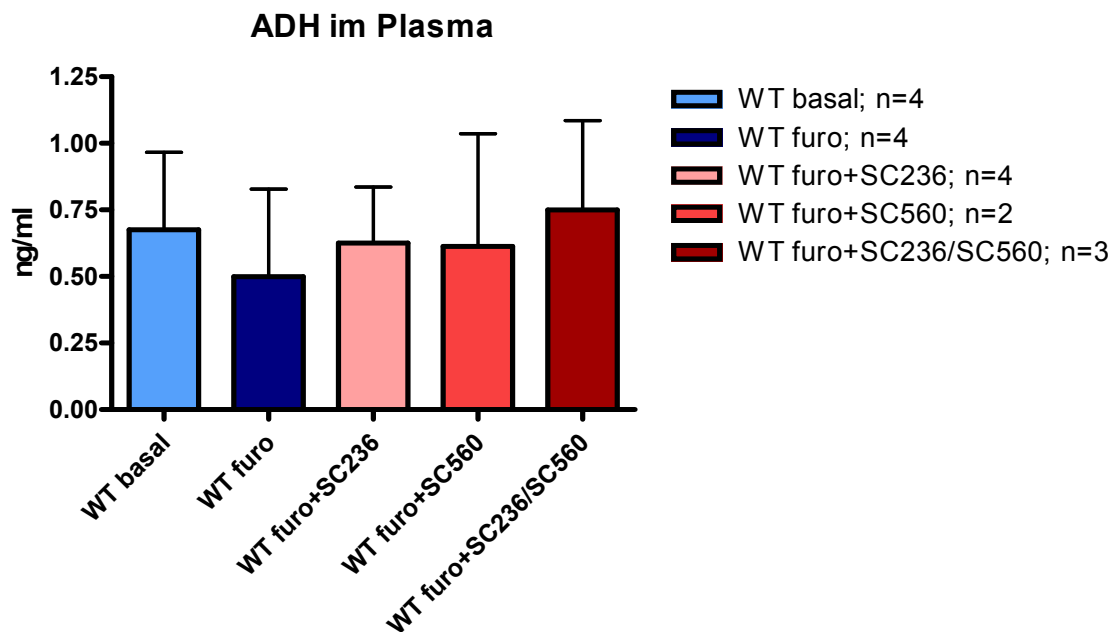


Abb.33: ADH im Plasma in ng/ml bei unbehandelten und behandelten Wildtyp- Tieren; Es konnten keine signifikanten Unterschiede ermittelt werden.

Die COX1^{-/-} und die COX2^{-/-} Mäuse reagierten auf diese Verabreichung mit einem ausgeprägtem Anstieg auf 2,0ng/ml und 6,1ng/ml.

Der Hemmer SC236 ließ die ADH-Konzentration bei COX1^{-/-} unter den Basalwert, auf 0,55ng/ml, fallen.

Durch die Verabreichung des selektiven COX1 Hemmers SC560 bei COX2^{-/-} fiel die ADH-Konzentration im Plasma signifikant auf 0,51ng/ml ab. (Abb.34)

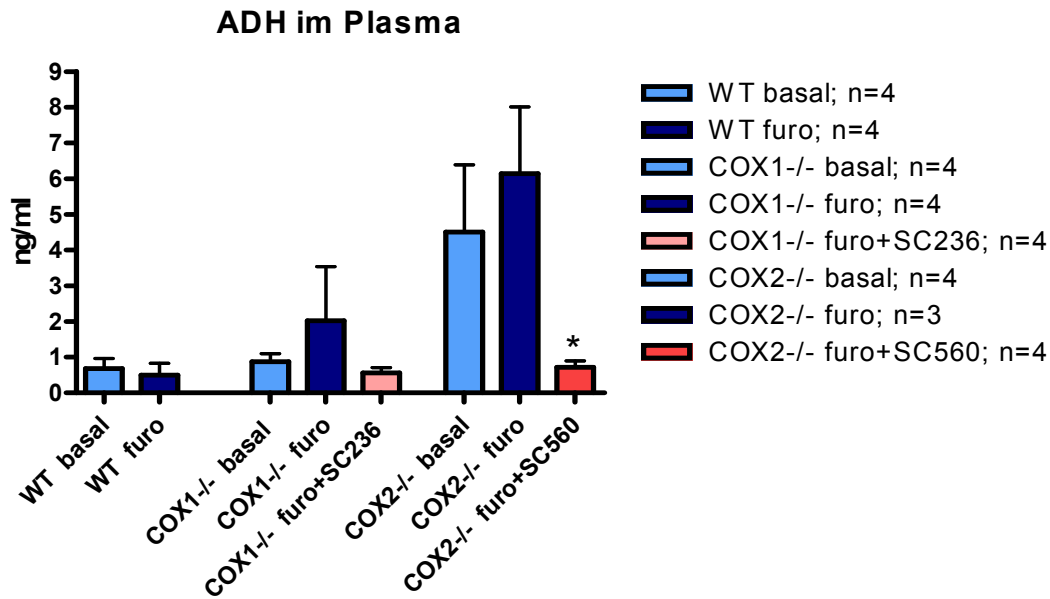


Abb.34: ADH im Plasma in ng/ml bei unbehandelten und behandelten Wildtyp-Tieren, COX1-/- und COX2-/-Mäusen; COX2-/- furo vs. COX2-/- furo+SC560 $P < 0,05$ (*)

III.9. Protein im Urin (mg/ml)

Auffallend an diesen Ergebnissen war, dass sich bei den Wildtyp-Tieren die Proteinkonzentrationen sowohl basal als auch unter Furosemid und nach Verabreichung der einzelnen Hemmer mit 0,3-0,45mg/24h sehr ähnlich waren. Erst die Kombination von SC236 und SC560 ließ die Konzentration von Protein im Urin signifikant auf 1,0 mg/24h ansteigen. (Abb.35)

Bei COX1-/- und bei COX2-/- führte bereits die Aufnahme des Furosemids zu einem signifikanten Anstieg der Proteinmenge im Vergleich zum basalen Wert. Sie stieg bei COX1-/- nach Injektion des SC236 noch weiter an.

Bei COX2-/- bewirkte die Injektion des SC560 einen geringen Abfall dieser Substanz im Urin. (Abb.36)

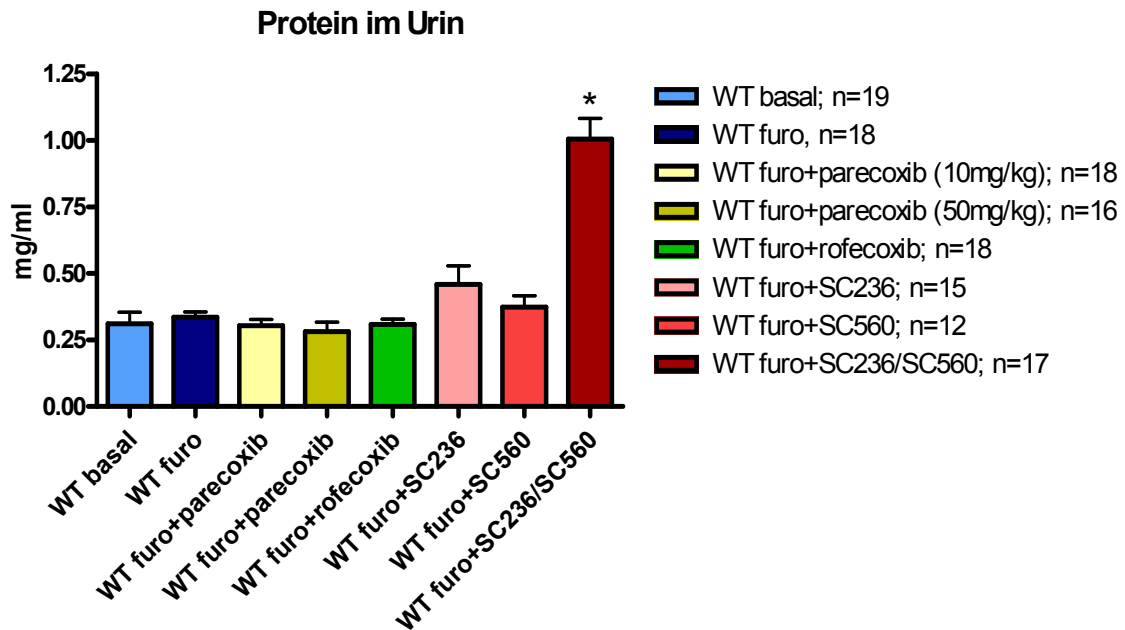


Abb.35: Protein im Urin in mg/24h bei unbehandelten und behandelten Wildtyp-Tieren; WT furo vs. WT furo+SC236 und SC560 $P < 0,05$ (*)

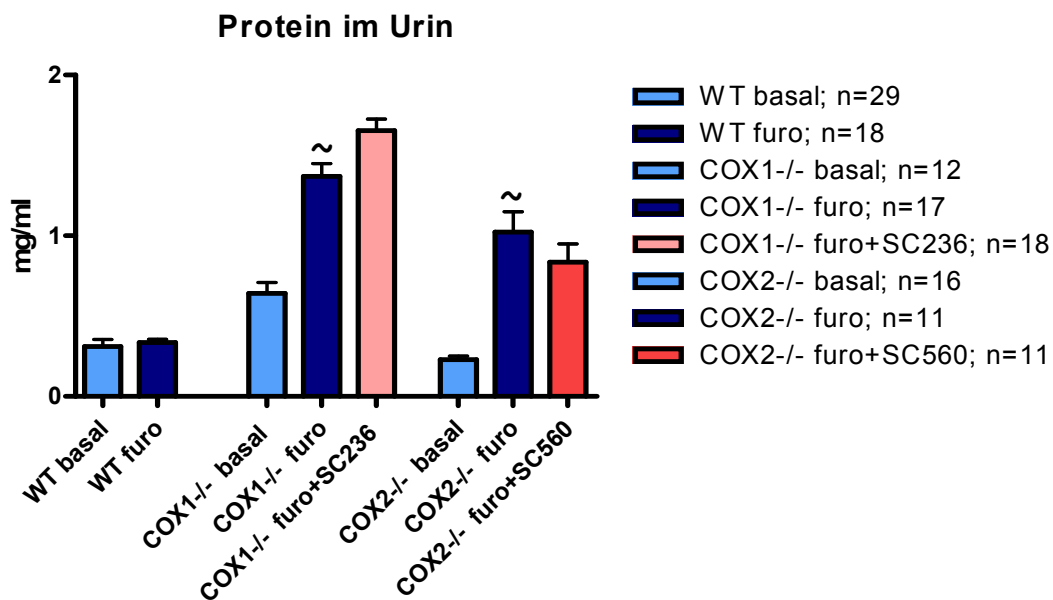


Abb.36: Protein im Urin in mg/24h bei unbehandelten und behandelten Wildtyp-Tieren, COX1-/- und COX2-/- Mäusen; COX1-/- basal vs. COX1-/- furo $P < 0,05$ (~); COX2-/- basal vs. COX2-/- furo $P < 0,05$ (~)

IV. Diskussion

Bei dem Hyperprostaglandin-E₂-Syndrom handelt es sich um eine autosomal-rezessiv auftretende Nierenerkrankung des Menschen.

Klinisch manifestiert sich diese Erkrankung bereits pränatal durch eine erhöhte fetale Polyurie und der Ausbildung eines Polyhydramnions, wodurch es in den meisten Fällen zu einer Frühgeburt kommt. Postnatal werden die erkrankten Kinder unter anderem durch einen starken renalen Wasser- und Elektrolytverlust, eine vermehrte Bildung von Renin und Aldosteron, dem Entstehen einer Nephrokalzinose, einer juxtaglomerulären Hypertrophie sowie durch das Auftreten von Fieber, Diarrhö und Gedeihstörungen auffällig [Seyberth et al, 1994]. Die Ursache des HPS/aBS liegt unter anderem in einer Mutation der Gene, die für die Kodierung des NKCC2-Kotransporters [Simon et al, 1996a] oder des Kaliumkanals ROMK zuständig sind [Simon et al, 1996b; Karolyi et al 1997].

Der wohl bedeutendste Aspekt bei diesem Syndrom ist die massiv erhöhte renale Prostaglandinausscheidung, vor allem des Prostaglandins E₂ und seines Hauptmetaboliten PGE-M, während andere Prostaglandine, wie das PGI₂, in einer fast unveränderten Konzentration im Urin vorliegen. Es wird davon ausgegangen, dass diese extreme Überproduktion für das klinische Bild der Patienten mitverantwortlich ist [Seyberth et al, 1985]. Unterstützt wird die Annahme dadurch, dass es nach der Behandlung mit Indometacin, einem nichtsteroidalen Antiphlogistikum und Prostaglandinsynthese-Hemmer, zu einer deutlichen Besserung der renalen und systemischen Symptome kommt [Seyberth et al, 1987].

Prostaglandine sind wichtige Mediatoren in der Physiologie und Pathophysiologie der Nieren. Sie beeinflussen beispielsweise die Ausschüttung des Renins, den epithelialen Salz- und Wassertransport und die glomeruläre Filtration, wobei die genauen molekularen Mechanismen noch ungeklärt sind [Breyer et al, 1996]. Das wichtigste Enzym, welches die Synthese der Prostaglandine katalysiert, ist die Cyclooxygenase (COX).

Eine Reihe von Säugetierarten, z.B. der Mensch, die Ratte, die Maus, sind in der Lage, mindestens zwei Isoformen der Cyclooxygenase, die COX1 und die COX2, in der Niere zu bilden [Khan et al, 1998].

Welche der beiden Isoformen nun die bedeutendere Rolle bei der Prostaglandinfreisetzung und somit bei der Regulation des Wasser- und Elektrolythaushaltes spielt, ist bis heute noch nicht geklärt.

In einigen Versuchen konnte bereits gezeigt werden, dass es nach der Gabe des Schleifendiuretikums Furosemid zu einer deutlichen Steigerung der renocorticalen COX2-mRNA sowie zu einem Anstieg des COX2-Proteins in den TALH-Zellen und in der Macula densa bei Nagetieren kommt. Auch bei Patienten mit dem genetisch bedingten HPS/aBS ist diese Konzentration erhöht, während bei gesunden Probanden keine erhöhten Werte nachgewiesen werden konnten [Kömhoff et al, 2000].

Untersuchungen an Ratten weisen darauf hin, dass unter Salzverlustbedingungen das PGE₂ über die COX2 gebildet wird und dieses Prostaglandin im Wesentlichen für die gesteigerte Diurese und damit für den erhöhten Wasser- und Elektrolytverlust verantwortlich ist [Kammerl et al, 2001]. Über welche Mechanismen und Rezeptoren das PGE₂ die Nierenfunktion beeinflusst, ist jedoch noch nicht nachvollziehbar.

Furosemid

Um einige der zuvor aufgeführten Fragen noch genauer zu untersuchen, wurde in diesen Versuchen das Schleifendiuretikum Furosemid sowohl bei den genetisch unbeeinflussten Wildtyp-Mäusen als auch bei den genetisch veränderten Knock-out-Mäusen (COX1^{-/-} und COX2^{-/-}) verwendet. Das Furosemid wurde im Urin der Tiere gemessen. Dies ermöglichte zu überprüfen, ob das Diuretikum über die Tränke aufgenommen wurde und ob es in einer wirksamen Konzentration im renalen Tubuluslumen vorlag.

Gewichtsbilanz

Mit Hilfe der Bestimmung des Gewichtsverlustes war es möglich, zu erkennen, ob es einen großen Stressfaktor für die Tiere darstellt, wenn sie sich im Stoffwechselkäfig befinden. Des Weiteren konnte überprüft werden, ob es durch die Verabreichung der selektiven Hemmer zu starken gesundheitlichen Problemen kommt, die sich unter anderem durch einen Gewichtsverlust auszeichnen würden.

Während die Tiere aqua ad libidum über die Tränke erhielten, war ein erkennbarer Gewichtsverlust festzustellen, der sich dadurch erklären lässt, dass sich die Tiere erst an ihre neue Umgebung gewöhnen mussten. Nach der Verabreichung der einzelnen Hemmer wurde mitunter sogar eine Gewichtszunahme festgestellt. Das Gewicht der Tiere ist dennoch über den Zeitraum des Experimentes als relativ stabil zu bezeichnen.

PGE₂

Die Annahme, dass die COX2 eine bestimmende Rolle bei der Regulation der Nierenfunktion spielt, hat sich auch am Tiermodell der Maus bestätigt. Das liegt zum einen darin begründet, dass die Prostaglandin E₂-Werte im Urin signifikant nach der Gabe des Furosemids über die Tränke sowohl bei den Wildtyp-Tieren als auch bei COX1-/- anstiegen. Bei COX2-/- hingegen zeigte dieser Wert, im Vergleich zum Basalwert, kaum eine Veränderung. Das lässt die Vermutung zu, dass das PGE₂ zu einem wesentlichen Anteil über die COX2 gebildet wird. Jedoch erfolgt die Produktion sicherlich nicht ausschließlich über die COX2, da die gemessenen Werte ungleich „Null“ waren und auch der hoch selektive COX1-Hemmer SC560 einen deutlichen Abfall der PGE₂-Werte bei dieser Versuchsgruppe bewirkte. Ebenso war bei den Wildtyp-Tieren und COX1-/- nach der Verabreichung der entsprechenden COX1- und COX2-Inhibitoren ein Abfall des PGE₂ zu verzeichnen, was auf einen Einfluss von beiden Coenzymen, wenn auch unterschiedlich bedeutend, auf diesen Parameter schließen lässt.

Diurese

Die Vermutung, dass der gesteigerte PGE₂-Spiegel einen Einfluss auf die gesteigerte Diurese hat, lässt sich auch anhand der ermittelten Daten nachvollziehen. Eine strenge Parallelität zwischen der Konzentration des PGE₂ im Urin und der Ausscheidungsmenge des Urins bei den einzelnen Versuchsgruppen konnte jedoch nicht festgestellt werden.

Es zeigte sich ein deutlicher Unterschied bei dem Anstieg unter Furosemid zwischen den drei Versuchsgruppen. Um etwa das Sechsfache stieg die Diurese bei den Wildtyp-Tieren und COX1^{-/-}. Bei COX2^{-/-} konnte lediglich ein Anstieg um das Zweifache festgestellt werden - eine Tatsache, die wieder mit der herabgesetzten Bildung des PGE₂ beim Knock-out-Tier und dem Einfluss des PGE₂ auf die Diurese in Verbindung gebracht werden kann.

Auf die Bedeutung der COX2 für die Diurese und den Salzverlust während der Furosemidaufnahme wiesen Kammerl et al 2001 am Modell der Ratte hin. Sie verwendeten den spezifischen COX2-Blocker Rofecoxib [Kammerl et al, 2001]. Durch Rofecoxib wurde die gesteigerte Prostaglandinproduktion gehemmt und die furosemidinduzierte Diurese um ca. 50% gesenkt. In den für diese Arbeit durchgeführten Versuchen wurde auch Rofecoxib bei den Wildtyp-Tieren verwendet. Hier ließ es jedoch die Diurese nicht so ausgeprägt sinken. Eine Reduzierung um nur 15% wurde festgestellt, während sich die gesteigerte Synthese des PGE₂ deutlich normalisierte und fast den Basalwert erreichte.

Durch die Verabreichung sowohl des selektiven Inhibitors SC236 als auch des SC560 und die Kombination der beiden wurde ein Rückgang der Diurese bei den Wildtyp-Tieren um mindestens 45% beobachtet. Ebenso bei den Knock-out-Tieren sank die Diurese sowohl unter SC236 als auch SC560, was darauf schließen lässt, dass diese nicht nur von den COX2 abhängigen Prostaglandinen beeinflusst wird.

Der deutliche Abfall dieses Parameters nach der Gabe des SC560 bei beiden Versuchsgruppen wurde nicht erwartet, aber es zeigt, dass die COX1 hier auch eine wichtige Rolle bei der Regulation zu spielen scheint. Die diuretische Wirkung des Furosemids konnte mit allen verwendeten Inhibitoren nur maximal auf 50% gesenkt werden.

Eine stärkere Reduzierung der Ausscheidungsmenge war mit den im Versuch verwendeten COX-Hemmern nicht zu erreichen.

Einsatz verschiedener COX2-Hemmer in vivo

Rofecoxib ist bereits bei HPS/aBS-Patienten zur Behandlung eingesetzt worden. Es liegen Untersuchungen von Haas et al vor, bei denen ein Patient von der Indometacintherapie auf dieses Medikament umgestellt wurde. Sein Allgemeinzustand konnte während der Therapie als gut bezeichnet werden.

Die negativen Begleitumstände, welche die hoch dosierte Indometacintherapie mit sich brachte, wurden nun nicht mehr beobachtet. Es wurden keine Nebenwirkungen bei dieser klinischen Untersuchung festgestellt [Haas et al, 2003]. Ebenso wurde der Einsatz des spezifischen COX-2-Hemmers Nimesulide bei dieser Patientengruppe getestet. Es gelang unter anderem, die Konzentration des Renins im Plasma und die PGE₂-Konzentration fast auf physiologische Werte zu senken. Auch ist der Elektrolytverlust soweit zurückgegangen, dass die Supplementation von Magnesium, Natrium und Kalium oral erfolgen konnte [Nüsing et al, 2003]. Der deutlichste Vorteil jedoch ist, dass es durch die fehlende Hemmung der COX-1 zu wesentlich weniger gastroduodenalen Nebenwirkungen kommt, im Gegensatz zur Behandlung mit dem nichtselektiv hemmenden Indometacin.

Die Wirkung der nichtsteroidalen Antiphlogistika (NSAID) beruht hauptsächlich auf der Synthesehemmung der Prostaglandine, indem die COX blockiert wird. Die unerwünschten Wirkungen auf den Magen-Darmtrakt, die Nieren und die Thrombozyten beschränken jedoch die Anwendung dieser Medikamentengruppe. Durch die Entdeckung der beiden Coenzyme und deren Funktionen war es möglich, selektive COX-Hemmer zu entwickeln. Die Erforschung der hämostatischen Wirkung der COX-1 und vor allem ihre Schutzwirkung auf den Magen-Darm-Trakt sowie die entzündungshemmende Wirkung der COX-2, ihre Schmerzlinderung und Fiebersenkung, hat die Entwicklung von selektiven COX-2-Hemmern gefördert.

Sie entfalten dieselbe Wirkung, jedoch weisen sie eine größere Magen-Darm-Toleranz auf [Warner et al, 1999]. Man darf diese Fortschritte aber nicht auf andere unerwünschte Nebenwirkungen übertragen, insbesondere nicht auf renale Nebenwirkungen. Hier zeigen die selektiven COX2-Hemmer ähnliche Komplikationen, wie die klassischen NSAID auf. Die häufigsten sind Ödeme (2-3%) und Bluthochdruck (1-2%) [Breyer et al, 2001; Whelton et al, 2001].

Risikofaktoren für eine erhöhte Toxizität der Hemmer weisen Patienten mit einem geringeren Blutvolumen auf, z.B. durch eine chronische Herz- oder Leberinsuffizienz, Blutungen oder durch die gleichzeitige Behandlung mit Diuretika [Burian et al, 2003]. Für solche Patienten werden regelmäßige Verlaufskontrollen während der Therapie angeraten.

Zahlreiche klinische Studien deuten darauf hin, dass sich das Spektrum der Therapie mit COX2-Hemmern noch erweitern könnte. Eines dieser Felder ist die Krebstherapie. In einigen soliden Tumoren, wie dem kolorektalen Karzinom [Williams et al; 1997] und dem Mamakarzinom [Brueggemeier et al; 1999], wurde eine erhöhte COX2-Expression nachgewiesen. Auch bei Patienten mit der Alzheimer-Krankheit könnten die selektiven COX2-Hemmer indiziert sein, da sich die Degeneration der Gehirnareale unter Mitwirkung der COX2 manifestiert [Tocca et al, 1997]. Erste Studien mit Rofecoxib als Prophylaxe fielen allerdings negativ aus [Aisen et al, 2003].

Die im Jahr 2000 veröffentlichten Studien mit Rofecoxib (VIGOR-Studie, VIOXX Gastrointestinal Outcomes Research) [Bombardier et al ; 2000] und Celecoxib (CLASS-Studie, Celecoxib Long-term Arthritis Safety Study) [Silverstein et al; 2000] zeigten, dass die in den Zulassungsstudien postulierte ca. achtfach geringere Inzidenz der Ulkuskomplikationen in der langfristigen Anwendung für diese Medikamente nicht mehr bestätigt werden kann.

Die VIGOR-Studie wies als erste auf eine mögliche kardiovaskuläre Toxizität der COX2-Hemmer hin. Hierbei wurde herausgefunden, dass die Einnahme von Rofecoxib im Vergleich zu Naproxen mit einem erhöhten Schlaganfall- und Herzinfarktrisiko verbunden ist [Bombardier et al, 2000]. Dies war der Grund für die Marktrücknahme des Rofecoxib durch den Hersteller MSD.

Als Ursache für das vermehrte Auftreten wird vermutet, dass durch die Hemmung der Synthese von Prostaglandinen und Prostacyclinen mehr PGG₂ und PGH₂ für die Bildung von Thromboxanen zur Verfügung steht, welche die Thrombozytenaggregation verstärken.

Elektrolyte Na⁺ und K⁺

Es ist bekannt, dass Prostaglandine eine große Bedeutung für den renalen Elektrolyt- und Wasserhaushalt haben. Eine Hemmung der Prostaglandinsynthese wird mit der gehemmten Ausscheidung von Elektrolyten und Wasser in Verbindung gebracht.

In den für diese Arbeit durchgeführten Versuchen wurden speziell die Ausscheidungen der Elektrolyte Na⁺ und K⁺ im Urin analysiert. Auffällig an der Na⁺-Ausscheidung war, dass es bei allen drei Versuchsgruppen zu einem signifikanten Anstieg unter Furosemid kam und sowohl die hoch selektiven COX1- als auch die hoch selektiven COX2-Hemmer zu einem sichtbaren Rückgang dieser Konzentrationen führten.

Auch bei dem Elektrolyt K⁺ war die vorgefundene Situation ähnlich: ein deutlicher Anstieg unter Furosemid bei den drei Versuchsgruppen und ein Abfall nach Verabreichung der Hemmer, der jedoch nicht so ausgeprägt ausfiel. Dies lässt die Vermutung zu, dass beide Coenzyme eine wichtige Funktion bei der Ausscheidung dieser Elektrolyte spielen. Zu ähnlichen Ergebnissen in Bezug auf die COX2 sind Kammerl et al 2001 gekommen, als sie die Veränderung der Elektrolytkonzentrationen Na⁺ und K⁺ im Urin von Ratten nach der Verabreichung von Furosemid ermittelten. Sie stellten einen deutlichen Anstieg dieser Ionen im Urin fest. Es gelang ihnen, die Ausscheidung mit Rofecoxib signifikant zu senken [Kammerl et al, 2001].

Durch den Einsatz des Parecoxib und des Rofecoxib war es in den durchgeführten Versuchen immer möglich, die Ausscheidungswerte zu senken. Ebenso konnte beobachtet werden, dass die hoch selektiven Hemmer SC236 und SC560 bei diesem Parameter einen noch stärkeren Rückgang bewirkten. Dass jedoch eine der beiden Isoformen mehr Einfluss auf die Elektrolytausscheidung hat, wurde anhand dieser Daten nicht festgestellt.

In den meisten vorangegangenen Studien wurde davon ausgegangen, dass die COX2 für die Elektrolytveränderungen unter Furosemid verantwortlich ist. Die Bedeutung der COX1 für diesen Parameter konnte in anderen Studien noch nicht dargestellt werden.

Trinkvolumen

Der Parameter Trinkvolumen ist kein eindeutig quantitativ bestimmbarer Parameter, da die vom Labortier getrunkene Wassermenge durch den Umgang mit den Käfigen während der täglichen Reinigung, aber auch durch das Leckverhalten der Tiere höher erscheint. Qualitative Aussagen können aber sehr wohl getroffen werden, da sich dieser mögliche Fehler durch alle Versuchsgruppen zieht.

Anhand der ermittelten Trinkvolumen- und Diuresedaten lässt sich feststellen, dass diese beiden einen sehr ähnlichen Verlauf nach Verabreichung des Furosemid und der selektiven Hemmer aufzeigen. Somit ist eine direkte Verbindung zwischen beiden Parametern nachweisbar.

Renin

Die Theorie, dass Prostaglandine eine Rolle bei der Reninsekretion spielen und diese stimulieren, wurde 1974 zuerst im Experiment an einem narkotisierten Hasen bestätigt. Er erhielt Infusionen mit Arachidonsäure. Daraufhin wurde ein ansteigender Reninwert festgestellt, und es gelang diesen durch eine weitere Infusion mit Indometacin zu senken [Larsson et al, 1974]. In einem späteren Versuch wurde erforscht, welche der beiden Isoformen und welcher Zelltyp der Niere für die Ausscheidung des Renins verantwortlich sind. Die Zellen des juxtaglomerulären Apparates eines Hasen wurden isoliert und durch die Reduzierung des intraluminalen NaCl kam es zu einer gesteigerten Reninsekretion. Die gewonnenen Daten veranschaulichen, dass NS-398, ein spezifischer COX2-Inhibitor, die Reninsekretion senkt, während Valerylsalicylat, ein COX1-Inhibitor, keinen Effekt zeigt [Traynor et al, 1999].

Vieles weist darauf hin, dass Prostaglandine, wie das PGE₂ und/oder PGI₂, die Reninausschüttung bei den isolierten juxtaglomerulären Zellen stimulieren können. Das setzt aber voraus, dass sich Rezeptoren für diese Prostaglandine auf den Zellen befinden [Jensen et al, 1996]. Die Frage über welche Rezeptoren die Reninbildung stimuliert wird, ist noch nicht vollständig beantwortet. Es wird angenommen, dass es sich um Subtypen des Prostaglandin-E₂-Rezeptors, z.B. EP₄ oder EP₂, handelt. Um die entsprechenden Rezeptoren zu ermitteln, würden sich Studien mit Knock-out-Mäusen oder mit spezifischen Hemmern für die EP-Rezeptoren anbieten.

Es ist bekannt, dass es durch die Verwendung von NSAID zu einer verringerten Reninproduktion kommt. Ebenso ist bekannt, dass Reninwerte zum Beispiel durch salzarme Diät oder eine forcierte Diurese induziert werden können [Harris et al, 1994].

In der folgenden Grafik ist dargestellt, wie sich der Defekt bei HPS/aBS-Patienten im m-TAL-Segment (medullary thick ascending limb of Henle's loop) nach dem heutigen Kenntnisstand auf die Salzresorption auswirkt [Nüsing et al, 2001]. (Abb. 37)

Trotz der anhaltend hohen Salzkonzentration im c-TAL-Segment (cortical thick ascending limb) wird an der Macula densa eine reduzierte Salzkonzentration registriert, da das NKCC2/ROMK-Resorptionssystem Teil des Salzdetektionssystems ist.

Daraufhin kommt es zu einer gesteigerten COX2-Expression, die vermutlich durch das mitogen-aktivierte Protein (MAP) kinase p38 stimuliert wird [Cheng et al, 2000]. Als Konsequenz daraus wird das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS) in den juxtaglomerulären Zellen (JGA) durch den an den cAMP gekoppelten Prostaglandin-E-Rezeptor EP₄ aktiviert [Breyer et al, 2000].

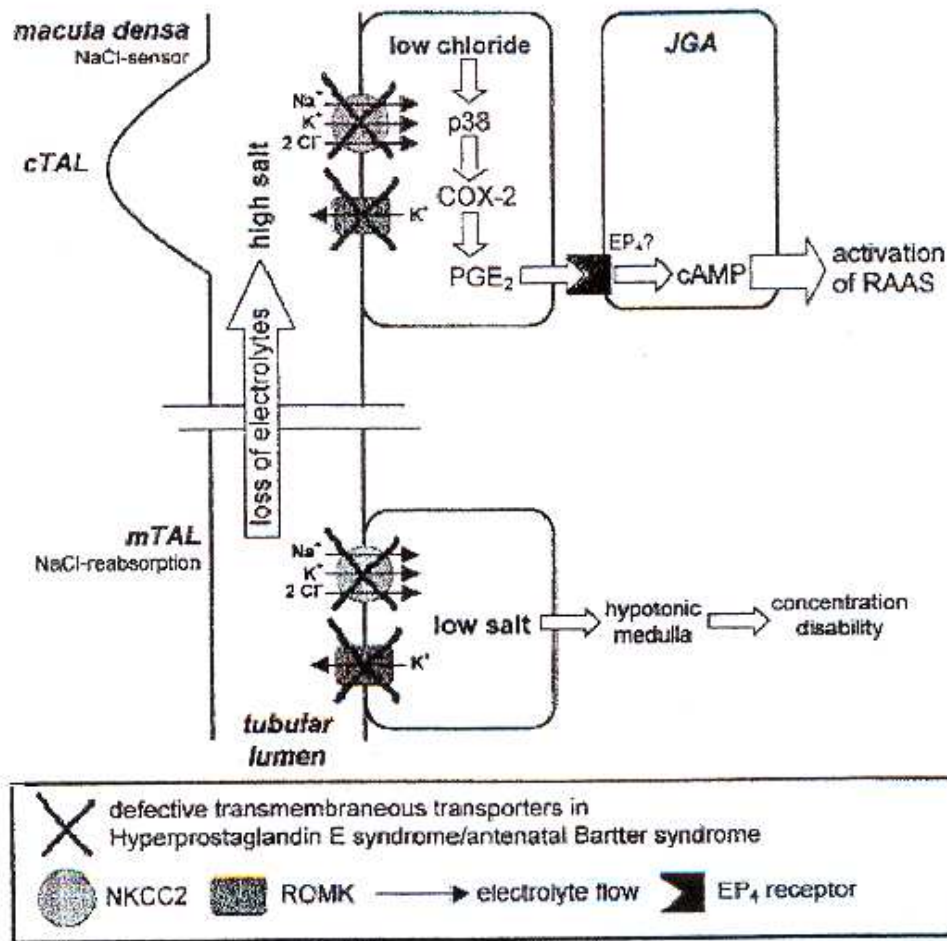


Abb.37: Pathophysiologische Auswirkungen des Defektes in der tubulären Salzresorption im m-TAL-Segment
entnommen aus „Pathogenetic role of cyclooxygenase-2 in hyperprostaglandin E syndrome/antenatal Bartter syndrome: Therapeutic use of the cyclooxygenase-2 inhibitor nimesulide“ Nüsing et al, 2001

In den zu dieser Arbeit vorgenommenen Versuchen wurde festgestellt, dass sich die Reninkonzentration signifikant unter Furosemid bei den Versuchsgruppen der Wildtyp-Tiere und der COX1^{-/-}-Mäuse erhöhte. Die gesteigerte Reninbildung wurde bei diesen zwei Versuchsgruppen durch die Verabreichung des SC236 wieder deutlich abgeschwächt.

Die Injektion des hoch selektiven COX1 Hemmers SC560 bewirkte bei den Wildtyp-Tieren nur einen schwachen Rückgang, was die bereits zuvor geschilderten Ergebnisse von Trayner et al 1999 in Bezug auf die Wirkung der COX1 und der COX2 bestätigen [Trayner et al, 1999].

Eine Abschwächung der Renin m-RNA Expression durch hoch selektive COX2 Hemmer, wie das SC236, konnten auch Cheng et al zeigen [Cheng et al, 1999]. Die basale Reninproduktion bei COX2^{-/-} ist signifikant reduziert, im Gegensatz zu den Wildtyp-Tieren und COX1^{-/-}-Mäusen. Nach der Verabreichung des Schleifendiuretikums Furosemid konnte ein Anstieg der Konzentration im Plasma beobachtet werden, aber dieser fiel geringer als bei den anderen Versuchsgruppen aus. Yang et al zeigten, dass die basale Renin-mRNA Expression in der Nierenrinde bei COX2^{-/-} signifikant reduziert ist im Vergleich zu den Wildtyp-Tieren, was sich mit den hier ermittelten Ergebnissen deckt. Bei deren Versuchen war jedoch ein geringerer Anstieg dieser Konzentration während einer salzarmen Diät zu verzeichnen [Yang et al, 2000].

Die Auswirkungen der zusätzlichen Hemmung der COX1 unter Furosemidverabreichung bei diesen Tieren wurden noch nicht in anderen Versuchen erforscht. Die in der vorliegenden Arbeit ermittelten Ergebnisse ergaben einen extremen Anstieg der Reninkonzentration um das Elffache. Eine eindeutige Ursache für diesen steilen Anstieg konnte nicht gefunden werden. Es wäre möglich, dass es durch die zusätzliche Hemmung zum Auslösen eines bisher ungeklärten Mechanismus' gekommen ist. Weitere Untersuchungen dieses Parameters sind zu überdenken.

Die Theorie, dass die COX2 einen größeren Einfluss auf die Ausschüttung des Renins hat, ist auch anhand dieser Versuche nachvollziehbar [Stichtenoth et al, 1998]. Durch das SC236 gelingt es deutlich, die Reninwerte zu senken, während das SC560 nur geringe Wirkung zeigt.

Dass jedoch die erhöhten PGE₂-Werte allein für die Ausschüttung zuständig sind, ist bei der Gegenüberstellung der Parameter PGE₂ und Renin nicht nachvollziehbar. Vielleicht sind noch andere von der COX2 gebildete Prostaglandine beteiligt, die, wie beim PGI₂ bereits gezeigt, direkt auf die reninproduzierenden Zellen wirken können.

ADH

ADH (antidiuretisches Hormon, Adiuretin, Vasopressin) ist ein Peptid aus 9 Aminosäuren.

Es wird aus dem Hypophysenhinterlappen bei Hyperosmolarität freigesetzt und fördert die Wasserrückresorption in der Niere.

ADH erhöht die Permeabilität des Sammelrohrepithels für Wasser, aber nicht für Salze. Dies geschieht auf folgende Weise: Wasser-Kanal-Proteine, so genannte Aquaporine, sind in der Epithelzelle in Vesikeln gespeichert. Bei Bindung von ADH an die Vesikel verschmelzen diese mit der luminalen Zellmembran und lassen Wasser entlang des osmotischen Gradienten einströmen. ADH veranlasst eine deutliche Verminderung des Harnvolumens. Die gesteigerte Wasserabsorption in den distalen Tubuli und in den Sammelrohren der Niere sowie die Flüssigkeitsaufnahme durch Trinken, gesteuert durch die Erregung des Durstzentrums, führen zu einer Normalisierung der Osmolarität. Das ADH wurde in diesen Versuchen aus dem Plasma der Tiere bestimmt. Bei den Wildtyp-Tieren zeigten sich sowohl nach Furosemid als auch nach der Verabreichung der selektiven Hemmer keine Veränderungen im Vergleich zum Basalwert. Die Theorie, dass ADH als Gegensteuermechanismus bei einer erhöhten PGE₂-Konzentration ausgeschüttet wird, lässt sich anhand dieser Werte nicht nachvollziehen.

Bei den Knock-out-Mäusen stellte sich die Situation etwas anders dar: Der Basalwert der COX1^{-/-} lag in etwa bei dem der Wildtyp-Tiere, der der COX2^{-/-} hingegen betrug etwa das Sechsfache der Vergleichsgruppen. Durch Furosemid stiegen die Werte deutlich an und die selektiven Hemmer ließen die Konzentrationen wieder fallen; bei COX2^{-/-} sogar unter die Basalwerte.

Anhand dieser Werte lässt sich ein Gegensteuermechanismus erkennen, der sich bei COX2^{-/-} jedoch nicht auf das PGE₂ zurückzuführen lässt. Auch sind die extrem erhöhten Werte in dieser Gruppe hiermit nicht erklärbar. Weitere Untersuchungen zur Klärung der neu aufgeworfenen Fragen sind anzustreben.

Protein

Durch die Bestimmung der Proteinkonzentration im Urin war es möglich, eine Schädigung der renalen Funktion aufzuzeigen, die entweder auf den Verlust der glomerulären Eiweißdichtigkeit oder einer Änderung der Tubulusfunktion zurückzuführen ist.

Bei den Wildtyp-Tieren war die Proteinkonzentration sowohl basal unter Furosemid als auch bei der Verwendung der einzelnen Hemmer sehr ähnlich. Dies lässt darauf schließen, dass die Nierenfunktion intakt war und noch keine glomeruläre Schädigung zu diesem Zeitpunkt vorlag. Durch die Kombination der hoch selektiven Hemmer SC236 und SC560 änderte sich das Bild drastisch. Ein Anstieg der Konzentration um das Dreifache war festzustellen. Das deutet darauf hin, dass sowohl die COX1 als auch die COX2 und deren Metabolite bei dem genetisch unbehandelten Tier eine wichtige, möglicherweise protektive Rolle seiner physiologischen Nierenfunktion spielen.

Bei den Knock-out-Mäusen war bereits nach der Verabreichung des Furosemids ein signifikanter Anstieg der Proteinkonzentration festzustellen. Durch die Verabreichung der Knock-out spezifischen Hemmer änderte sich dieses Bild nicht. Hier stellt sich die Frage, ob es durch das Fehlen der entsprechenden Enzyme zu einer Veränderung der Nieren kommt, deren Funktion dann bereits bei der Verabreichung des Furosemids beeinträchtigt ist.

Berichte über renale Missbildungen bei Neugeborenen, deren Mütter während des dritten Trimesters der Schwangerschaft NSAID einnahmen, zeigen, dass Prostaglandine ebenfalls eine wichtige Rolle bei der Nierenentwicklung des Kindes spielen [Voyer et al, 1994].

Der kritischste Zeitpunkt für eine Schädigung der menschlichen Nieren liegt wahrscheinlich im Intervall zwischen der 20. und der 35. Schwangerschaftswoche [Peruzzi et al, 1999]. Über ähnliche Symptome wurde bei COX2^{-/-} und bei dem Nachwuchs von tragenden Mäusen, die den spezifischen Blocker SC236 erhielten, berichtet [Kömhoff et al, 2000]. Da weder COX1^{-/-} noch Mäuse, die mit dem selektiven COX1 Hemmer SC560 behandelt wurden, eine atypische Nierenentwicklung aufwiesen, wird der COX2 hier die bedeutendere Rolle zugeschrieben [Morham et al, 1995; Dinchuk et al, 1995].

Die geschilderten Erkenntnisse über die COX2-/- decken sich mit den aktuellen Vorstellungen, nur sind die gestiegenen Proteinkonzentrationen bei COX1-/- in diesen Versuchen damit nicht erklärbar, und es spielen sicherlich noch andere Mechanismen für eine physiologische Funktion der Niere eine wichtige Rolle. Allerdings muss auch berücksichtigt werden, dass die in diesem Versuch verwendeten Tiere acht bis zwölf Wochen alt sind, die Nieren schon vollständig ausgereift und die verabreichten Hemmer somit keinen Einfluss mehr auf die Entwicklung, sehr wohl aber auf die Funktion ausüben können.

Die ermittelten Daten am Tiermodell sind nicht ohne weiteres auf den Menschen übertragbar, da sich die Nierenentwicklung beim Menschen von der eines Tieres unterscheidet. Dennoch sollten, seit bekannt ist, dass die physiologische Entwicklung und Funktion der Niere abhängig von einer unbeeinflussten COX2-Aktivität ist, diese Hemmer mit besonderer Vorsicht prä- und postnatal eingesetzt werden.

Wie bereits zuvor erwähnt, ist das HPS/aBS mit dem Erscheinen bei einem Kind je 50.000 Geburten eine selten auftretende Krankheit. Für die betroffenen Kinder stellt sich hier sehr schnell ein lebensbedrohlicher Zustand ein. Deshalb wurde und wird intensiv an der frühen Erkennung der Krankheit geforscht. Die genetische Analyse an Amnionzellen durch die Bestimmung der Mutation am Kalium Kanal ROMK (*KCNJ1*) erlaubt eine frühzeitige Diagnose dieser Erkrankung. Sie ermöglicht den Beginn einer pränatalen Indometacintherapie, welche als Standardtherapie bei diesen Patienten angewendet wird.

Der Vorteil der frühen Behandlung konnte am Beispiel eines Geschwisterpärchens gezeigt werden: Bei dem Jüngeren wurde das HPS/aBS in der 26. Schwangerschaftswoche festgestellt und eine Indometacintherapie von der 26. bis zur 31. Schwangerschaftswoche durchgeführt. Während dieser Schwangerschaft wies die Mutter keinen Polyhydramnion auf, im Gegensatz zur Schwangerschaft mit seinem älteren Bruder, dessen Erkrankung erst im Alter von zwei Monaten diagnostiziert wurde. Auch postnatal erlaubt die frühe Diagnose eine effektive Wasser- und Elektrolytsubstitution, wodurch einem dramatischen Salz- und Volumenmangel vorgebeugt werden kann.

Ebenso kann die Entstehung einer Nephrokalzinose vermieden werden [Konrad et al, 1999]. Bei einer frühen und konsequenten Behandlung ist die Prognose für die erkrankten Kinder als gut zu bezeichnen.

Reinalter et al untersuchten Nierenbiopsien von HPS/aBS Patienten, die mit einer Indometacintherapie über einen Zeitraum bis zu 16 Jahren behandelt wurden. Dabei wurden keine histologischen Veränderungen festgestellt, die auf diese Therapie zurückzuführen sind [Reinalter et al, 2001].

Gastrointestinale Nebenwirkungen jedoch werden regelmäßig bei diesen Patienten als eine Konsequenz der Langzeittherapie mit Indometacin beobachtet [Seyberth et al, 1998]. Auch wird durch die antipyretischen Eigenschaften des COX2-Hemmers das Auftreten von Fieber unterdrückt und somit das Erkennen von Infektionskrankheiten erschwert. Die bereits erwähnten Vorteile der Therapie überwiegen jedoch deutlich und rechtfertigen die Anwendung dieser Medikamente.

V. Zusammenfassung

Patienten mit dem Hyperprostaglandin-E₂-Syndrom/antenatalen Barttersyndrom (HPS/aBS) weisen typischerweise neben einer erhöhten renalen Salz- und Wasserausscheidung eine verstärkte Reninproduktion, eine Hyperkaziurie und eine Hypertrophie des juxtaglomerulären Apparates auf. Auffällig werden die Patienten bereits pränatal durch eine fetale Polyurie, die zu einem Polyhydramnion mit bis zu zehn Litern Fruchtwasser führt und dieser wiederum für eine extrem gesteigerte Frühgeburtsrate zwischen der 28. und 34. Schwangerschaftswoche verantwortlich ist. Das Leitsymptom dieses Syndroms ist die massiv erhöhte renale Ausscheidung des Prostaglandins E₂, welches für die klinischen Symptome, wie Durst, Fieber und Wachstumsbeeinträchtigungen verantwortlich gemacht wird.

In den für die vorliegende Arbeit durchgeführten Versuchen sollte am Tiermodell der Maus gezeigt werden, welche der Cyclooxygenaseisoformen COX1, COX2 für die Produktion dieses Prostaglandins und für die Veränderung anderer Parameter, wie der Reninausscheidung, der Diurese und der Elektrolytausscheidung, bestimmend sind.

Um diese Fragen zu klären, wurden zwei verschiedene Ansätze gewählt: einmal der genetische Ansatz mit der Verwendung der Knock-out-Mäuse für die Cyclooxygenase 1(COX1^{-/-}) und 2(COX2^{-/-}) sowie einmal der pharmakologische Ansatz mit der Verwendung der unterschiedlich selektiven COX1 und COX2 Hemmer (Parecoxib, Rofecoxib, SC236 und SC560). Der Einsatz des Schleifendiuretikums Furosemid ermöglichte es, die Symptome des HPS/aBS zu simulieren und genauer zu untersuchen.

Nach diesen Versuchen war erkennbar, dass die COX2, extrapoliert anhand des Tiermodells, einen größeren Einfluss auf das klinische Erscheinungsbild der Patienten hat. Diese Aussage wird auch durch bereits veröffentlichte Studien belegt. Jedoch ließ sich ebenso feststellen, dass der in diesen Versuchen eingesetzte COX1 Hemmer SC560 sowohl bei der PGE₂-Produktion als auch bei der Diuresesenkung einen Effekt zeigte, über den in dieser Form in der Literatur noch nicht berichtet wurde.

Weiterhin lässt sich die Aussage treffen, dass sich durch das klassische COX1 und COX2 Modell nicht alle ermittelten Ergebnisse erklären lassen.

Denkbar wäre, dass in der Niere auch noch weitere Isoformen der COX existieren, die bisher noch nicht entdeckt wurden und ebenfalls einen Einfluss auf eine physiologische Nierenfunktion haben.

Schlussfolgernd lässt sich ableiten, dass es durch die Gabe des Rofecoxibs und des Parecoxibs immer zu Veränderungen an den untersuchten Parametern kam und die Wirkung des Furosemids durch diese Medikamente vermindert wurde. Mit dem Einsatz der hoch selektiven Hemmer SC236 und des SC560 gelang es in der Regel, die Werte noch näher an den Basalwert heranzubringen.

Die Frage, wie das PGE₂ in den Salz- und Wasserhaushalt eingreift und über welche Rezeptoren diese Informationen weitergegeben werden, ist noch immer nicht beantwortet.

Diese Zusammenhänge sollten in weiteren Versuchen geklärt werden.

VII. Literaturverzeichnis

Aisen P, Schafer K, Grundman M et al *Effects of rofecoxib or naproxen vs placebo on Alzheimer disease progression: a randomized controlled trial.*

JAMA 289 (2003)

Bartter SC, Pronove P, Gill JR, MacCardle RC et al *Hyperplasia of the juxtaglomerular complex with hyperaldosteronism and hypokalemic alkalosis*

Am J Med 33 (1962)

Beerman B et al *Aspects on pharmacokinetics of some diuretics*

Acta Pharmacol Toxicol (1984)

Brater DC et al *Diuretic therapy*

N Engl J Med 339 (1998)

Breyer MD, Breyer RM et al *Prostaglandin-E-receptors and the kidney*

Am J Physiol Renal Physiol 279 (2000)

Breyer MD, Harris RC et al *Cyclooxygenase2 and the kidney*

Curr. Opin. Nephrol. Hypertens. 10 (2001)

Bombardier C, Laine L, Reicin A et al *Comparison of upper gastrointestinal toxicity of rofecoxib and naproxen in patients with rheumatoid arthritis VIGOR Study Group*

N Engl J Med 343 (2000)

Brueggemeier RW, Quinn AL, Parrett ML et al *Correlation of aromatase and Cyclooxygenase gene expression in human breast cancer specimens*

Cancer Lett 140 (1999)

Burian M, Geisslinger G et al *Klinische Pharmakologie der selektiven COX2-Hemmer*

online publiziert am 2.Oktober 2003

Chandrasekharan N.V., Dai H., Roosn K.L., Evanson N.K., Tomsik J., Elton T.S., Simmons D.L. et al *COX-3, a cyclooxygenase-1 variant inhibited by acetaminophen and other analgesic/ antipyretic drugs: cloning, structure, and expression*

Proc Natl Acad Sci USA 32 (2002)

Cheng HF., Wang JL., Zhang MZ. et al *Angiotensin II attenuates renal cortical cyclooxygenase-2 expression*

J Clin Invest 103 (1999)

Cheng HF, Wang JL, Zhang MZ, McKanna JA, Harris RC et al *Role of p38 in regulation of renal cortical Cyclooxygenase-2 expression by extracellular chloride*

J Clin Invest 106 (2000)

De Witt DL, Smith WL et al *Primary structure of prostaglandin G/H synthase from sheep vesicular gland determined from the complementary DNA sequence*

Proc Natl Acad Sci USA (1988)

Dinchuk JE, Car BD, Focht RJ et al *Renal abnormalities and an altered inflammatory response in mice lacking cyclooxygenase II*

Nature 378 (1995)

Downing G, Egelhoff J, Daily D, Thomas M, Alon U et al *Kidney function in very low birth weight infants with furosemid-related renal calcifications at ages 1 to 2 years*

J Pediatr 120 (1992)

Ecelbarger CA, Terris J, Hoyer J, Nielson S, Wade J, Knepper MA et al

AM J Physiol 271 (1996)

Fanconi A, Schachenmann G, Nüssli R, Prader et al *A chronic hypokalaemia with growth retardation, normotensive hyperrenin-hyperaldosteronism ("Bartters syndrome"), and hypercalciuria*

Helv Paediat Acta 2 (1971)

Fogo A, Yoshida Y, Yared A, Ichikawa I et al *Importance of angiogenic action of angiotensin II in the glomerular growth of maturing kidney*

Kidney Int 38 (1990)

Fossilien et al *Molekular pathology of cyclooxygenase-2 in neoplasia*

Ann Clin Lab Sci 30 (2000)

Giebisch G et al *Coupled ion and fluid transport in the kidney*

N.Engl.J.Med.278 (1972)

Gitelman HJ, Graham JB, Welt LG et al *A new familial disorder characterized by hypokalaemia and hypomagnesaemia*

Trans. Assoc. Am. Physicians 79 (1966)

Greger et al

Physiol Rev 65 (1985)

Greger R, Heidland A et al *Action and clinical use of diuretics*

Oxford textbook of clinical nephrology (1998)

Herbert RL, Jacobson HR, Beyer MD et al *PGE₂ inhibits AVP-induced water flow in cortical collecting ducts by protein kinase C activation*

Am J Physiol (1990)

Haas M, Forbush B et al *The Na-K-Cl cotransporter of secretory epithelia*

Annu Rev Physiol 62 (2000)

Haas NA, Nossal R, Schneider CH, Lewin MA, Ocker V, Holder M, Uhlemann F et al *Successful management of an extreme example of neonatal hyperprostaglandin-E₂-syndrom (Bartter's syndrome) with the new cyclooxygenase-2 inhibitor rofecoxib*

Pediatr. Crit. Care Med. 4(2) (2003)

Harris RC, McKanna JA, Akai Y et al *Cyclooxygenase-2 is associated with the macula densa of rat kidney and increases with salt restriction*

J Clin Invest 94 (1994)

Hufnagle K, Khan S, Penn D, Caciarelli A, Williams P et al *Renal calcifications: A complication of long-term furosemid therapy in preterm infants*

Pediatrics 70 (1982)

Jeck N, Reinalter S, Henne T, Marg W, Mallmann R, Pasel K, Vollmer K, Klaus G, Leonhardt A, Seyberth HW, Konrad M *Hypokalemic salt-losing tubulopathy with chronic renal failure and sensorineural deafness*

Pediatrics 108 (2001)

Jensen BL, Schmid C, Kurtz et al *Prostaglandins stimulate rennin secretion and renin m RNA in mouse renal juxtaglomerular cells*

Am J Physiol Renal Fluid Elektrolyte Physiol 271 (1996)

Kammerl NC, Nüsing RM, Richthammer W, Kramer BK, Kurtz et al *Inhibition of COX2-counteracts the effects of diuresis in rats*

Kidney Int 60 (2001)

Karolyi L., Konrad M., Köckerling A. et al. *Mutations in the gene encoding the inwardly-rectifying renal potassium channel, ROMK, cause the antenatal variant of Bartter syndrome: evidence for genetic heterogeneity.*

Hum Mol Genet 6 (1997)

- Khan KN**, Venturini CM, Bunch RT et al *Interspecies differences in renal localization of cyclooxygenase isoforms: Implications in nonsteroidal anti-inflammatory drug-relevant nephrotoxicity*
Toxicol Pathol 26 (1998)
- Khan M**, Paulson SK, Verburg K, Lewkowitz JB, Maziasz TJ et al *Pharmacology of cyclooxygenase-2 inhibition in the kidney*
Kidney Int 61 (2002)
- Konrad M**, Leonhardt H, Hensen P, Seyberth HW, Köckerling A et al *Prenatal and postnatal management of hyperprostaglandin-E-syndrom after genetic diagnosis from amniocytes*
Pediatrics 103 (1999)
- Köckerling A**, Konrad M, Barth H et al *Prä- und postnatales Management des Hyper-PGE-Syndroms bei nachgewiesener ROMK-Mutation*
Z Gebuth Neonatol (1997)
- Köckerling A**, Konrad M, Seyberth HW et al *Hereditäre Tubulopathien mit Diuretika-ähnlichem Salzverlust*
Dt. Ärzteblatt (1998)
- Kömhoff M**, Gröne HJ, Klein T, Seyberth HW, Nüsing RM et al *Localization of cyclooxygenase-1 and -2 in adult and fetal human kidney: implication for renal function*
Am Physiol 272 (1997)
- Kömhoff M.**, Wang JL., Cheng HF. et al *Cyclooxygenase-2-selective inhibitors impair glomerulogenesis and renal cortical development*
Kidney Int 57: (2000)
- Kömhoff M.**, Jeck NDM., Seyberth HW: et al *Cyclooxygenase-2 expression is associated with the renal macula densa of patients with Bartter-like syndrome*
Kidney Int 58 (2000)
- Larsson C**, Weber P, Anggard E. et al *Arachidonic acid increases and indomethacin decreases plasma renin activity in the rabbit*
Eur.J.Pharmokol 28 (1974)
- Masferrer JL**, Zweifel BS, Manning PT et al *Selective inhibition of inducible cyclooxygenase 2 in vivo is anti-inflammatory and nonulcerogenic*
Proc Natl Acad Sci USA (1994)

Mc Credie DA Variants of Bartter's syndrome

Pediatr. Nephrol. 10 (1996)

Morham SG, Langenbach R, Loftin CD et al *Prostaglandin synthase 2 gene disruption causes severe renal pathology in the mouse*

Cell 83 (1995)

Mount DB, Baackgod A, Hall AE, Plata C, XU J, Beier D, Gamka G, Herbert SC et al *Isoforms of the Na-K-2Cl cotransporter in the murine TAL.I. Molecular characterisation and intrarenal localisation*

Am J Physiol Renal Physiol 276 (1999)

Nielson S, Maunsbach AB, Ecelbarger CA, Knepper MA *Ultrastructural localisation of Na-K-2Cl-Cotransporter in thick ascending limb and macula densa of rat kidney*

Am J Physiol Renal Physiol 275 (1998)

Nüsing RM, Klein T, Pfeilschifter J, Ullrich V et al *Effect of cyclic AMP and prostaglandin E(2) on the induction of nitric oxid-prostanoid-forming pathways in cultured rat mesangial cells*

Biochem J (1996)

Nüsing RM, Reinalter SC, Peters M, Kömhoff M, Seyberth HW et al *Pathogenetic role of Cyclooxygenase-2 in hyperprostaglandin E syndrome/antenatal Bartter syndrome: Therapeutic use of the Cyclooxygenase-2 inhibitor nimesulide*

Clinical pharmacology & therapeutics Volume 70, number4 (2001)

Nüsing RM, Seyberth HW et al *The role of cyclooxygenases and prostanoid receptors in Furosemid-like salt losing tubulopathy: the hyperprostaglandin E syndrome*

Acta Physiol Scand 181 (2004)

Obermüller N, Kunchaparty S, Ellison DH, Bachmann S *Expression of the Na-K-2Cl cotransporter by macula densa and thick ascending limb cells of rat and rabbit nephron*

J Clin Invest 98 (1996)

Peruzzi L, Gianoglio B, Porcellini MG, Coppo R et al *Neonatal endstage renal failure associated with maternal ingestion of Cyclooxygenase-2 selective inhibitor nimesulide as tocolytic*

Lancet 345 (1999)

Pine B, Lestnange N, Mater E, Levine O et al *Diuretic induced growth failure in rats and is reversal by sodium repletion*

J Pharmacol Exp Ther 242 (1987)

- Radeck W**, Heller M et al *Improved method for the determination of furosemid in plasma by high-performance liquid chromatography*
JChromatogr. 497 (1989)
- Reinalter SC**, Grone HJ, Konrad M, Seyberth HW, Klaus G *Evaluation of long-term treatment with Indometacin in hereditary hypokalemic salt-losing tubulopathies*
J Pediatr 139 (2001)
- Samuelsen B** et al
Biosci Rep.3 (1983)
- Schnermann J**, Ploth DW, Hermle M et al
Pflügers Arch 362 (1976)
- Schwartz ID**, Alon US *Bartter syndrome revisited*
J Nephrol. 9 (1996)
- Seidel C**, Reinalter SC, Seyberth HW, Schärer K et al *Prepubertal growth in the hyperprostaglandin E syndrome*
Pediatr Nephrol (1995)
- Seyberth HW**, Rascher W, Schweer H, Kühl PG, Mehls O, Schärer K et al *Congenital hypokalemia with hypercalciuria in preterm infants: a hyperprostaglandinuric tubular syndrome different from Bartter syndrome*
J Pediatr 107 (1985)
- Seyberth HW**, Königer SJ, Rascher W, Kühl PG, Schweer H et al *Role of prostaglandins in hyperprostaglandin E syndrome and in selected renal tubular disorders*
Pediatr Nephrol 1 (1987)
- Seyberth HW**, Leonhardt A, Soergel M et al *Das Hyperprostaglandin-E₂-Syndrom*
Monatsschr. Kinderheilkd 142 (1994)
- Seyberth HW**, Soergel M, Köckerling A et al *Hypokalaemic tubular disorders: the hyperprostaglandin E syndrome and Gitelman-Bartter syndrome*
in: Davison AM, Cameron JS, Gruenfeld JP, Kerr DNS, Ritz E, Winearls CG: Oxford Textbook of clinical Nephrology, 2nd edition. Oxford, New York, Tokio: Oxford University Press (1998)
- Shankar S**, Brater D et al *Loop diuretics: From the NKCC2 transporter to clinical use*
Am J Physiol Renal Physiol 284 (2003)

Shoemaker L, Welch TR, Bergstrom W, Abrams SA, Yergey AL, Vieira N et al *Calcium kinetics in the hyperprostaglandin E syndrome*

Pediatr Res 33 (1993)

Silverstein FE, Faich G, Goldstein JL et al *Gastrointestinal toxicity with celecoxib vs nonsteroidal anti-inflammatory drugs for osteoarthritis and rheumatoid arthritis: the CLASS-study: A randomized controlled trial. Celecoxib Long-term Arthritis Safety Study*

JAMA 284 (2000)

Simon DB 1, Karet FE, di Pietro A et al *Bartters syndrome, hypokalemic alkalosis with hypercalciuria, is caused by mutations in the Na-K-Cl cotransporter NKCC2*

Nature Genet 13 (1996a)

Simon DB 2, Karet FE et al *Genetic heterogeneity of Bartters syndrome revealed by mutations in the K channel ROMK*

Nature Genet 14 (1996b)

Smith WL, Bell TG et al *Immunohistochemical localization of the prostaglandin-forming Cyclooxygenase in renal cortex*

Am J Physiol 235 (1978)

Stichtenoth DO, Wagner B, Fröhlich JC et al *Effect of selective inhibition of the inducible Cyclooxygenase on renin release in healthy volunteers*

J Invest 46 (1998)

Tocca G, Freire-Moar J, Schreiber SS et al *Maturational regulation and regional induction of cyclooxygenase-2 in rat brain: implications for Alzheimer's disease*

Exp Neurol 144 (1997)

Traynor TR, Smart A, Briggs J, Schnermann J et al *Inhibition of macula densa stimulated renin secretion by pharmacological blockade of cyclooxygenase-2*

Am J Physiol 277 (1999)

Vane, J.R. et al *Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for aspirin-like drugs.*

Nat New Bio 231 (1971).

Voyer LE, Drut R, Mendez JH et al *Fetal maldevelopment with oligohydramnions following maternal use of piroxicam*

Pediatr Nephrol 8 (1994)

- Warner TD**, Guiliano F, Vojnovic I et al *Nonsteroid drug selctivities for cyclo-oxygenase-1 rather than cyclo-oxygenase-2 are associated with human gastrointestinal toxicity: A full in vitro analysis*
Proc Natl Acad Sci USA 96 (1999)
- Whelton A** et al *Cyclooxygenase-2-specific inhibitors and cardiorenal function: a randomized, controlled trial of celecoxib and Rofecoxib in older hypertensive osteoarthritis patients*
Am J Ther 8 (2001)
- Williams CS**, Smalley W, DuBois RN et al *Aspirin use and potential mechanismus for colorectal cancer prevention*
J Clin Invest 100 (1997)
- Wolf G**, Neilson EG et al *Angiotensin II as a renal growth factor*
J Am Soc Nephrol 3 (1993)
- Xie W**, Chipman JG et al *Expression of a mitogen-responsive gene encoding prostaglandin synthase in regulated by mRNA splicing*
Proc Natl Acad Sci USA (1991)
- Yang T**, Singh I, Pham H, et al *Regulation of cyclooxygenase expression in the kidney by dietary salt intake*
Am J Physiol 274 (1998)
- Yang T**, Endo Y, Huang YG, Smart A, Briggs JP, Schnermann J et al *Renin expression in COX-2-knockout mice on normal or low-salt diets*
Am J Physiol 279 (2000)

VIII. Anhang

VIII.1. Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Katja Luise Beinhorn
Wohnort	Vellmar
Geburtsdatum	18.12.1979
Geburtsort	Erfurt
Familienstand	verheiratet

Schulbildung	1986-1990	Dr. Theodor Neubauer Schule, POS 11, Erfurt
	1990-1998	Abitur am Königin Luise Gymnasium, Erfurt
Pflegepraktikum	1998-1999	FSJ im Bereich der Altenpflege im Sankt-Elisabeth-Heim in Erfurt
Studium	1999-2004	Studium der Zahnmedizin an der Philipps-Universität in Marburg
Berufspraxis	seit Sept. 2004	Assistenz Zahnärztin in der Zahnarztpraxis Dres. Plewe, Kassel
Qualifikationen	2005	Tätigkeitsschwerpunkt Kinderzahnheilkunde mit Abschluss im Sommer 2006

VIII. 2. Akademische Lehrer

Aumüller, Austermann, Berninger, Betke, Cetin, Coca, Czybyko, Daut, Eckhorn, Feusinger, Flores-de-Jacobi, Folz, Geuss, Gloerfeld, Gössel, Hartmann, Henze, Hertkamp, Höffken, Hörschgen, Holzheidt, Kern, Klimek, Knüppel, Kolmann, Lammel, Lang, Lehmann, Löffler, Lotzmann, Lucci, Mengel, Mesinovic, Mittag, Momeni, Mutters, Neumüller, Pieper, Petz, Sonnenschein, Radzak, Ramaswamy, Rausch, Röhm, Rogausch, Seitz, Siegel, Sonntag, Stachniss, Steiniger, Stelzel, Stiletto, Stöver, Stoll, Suske, Umstadt, Walther, Weihe, Wenz, Westermann, Zimmermann

VIII.3. Danksagung

Ich danke Herrn Prof. R.M. Nüsing für die vertrauensvolle Überlassung dieses Themas und für die stetige Bereitschaft, entstandene Fragen zu klären und bei Problemen zu helfen.

Des Weiteren möchte ich mich bei Frau Antje Treude, bei Frau Annika Schuster und bei Frau Stefanie Achenbach für die Aufzucht der Mäuse, bei Prof. Kleinen für die Elektrolytbestimmung, bei Herrn Bernhard Watzer für die Furosemidbestimmung und bei Herrn Boye Jensen für die Reninbestimmung bedanken.

Von ganzem Herzen danke ich meinen Eltern und Großeltern für ihr Interesse an dieser Arbeit und für ihre liebevolle Unterstützung.

Meinem Mann gebührt besonderer Dank. Er hat mir während der gesamten Zeit in allen Bereichen helfend zur Seite gestanden.

VIII.4. Ehrenwörtliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die dem Fachbereich Medizin Marburg zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel **Funktionen der Cyclooxygenaseisoformen an einem Tiermodell des Hyperprostaglandin-E2-Syndroms/antenatalen Barttersyndrom** im Medizinischen Zentrum für Kinder- und Jugendmedizin der Philipps-Universität Marburg unter Leitung von Herrn Prof. Dr. R. F. Maier mit Unterstützung durch Herrn Prof. Dr. R. Nüsing ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation angeführten Hilfsmittel benutzt habe. Ich habe bisher an keinem in- und ausländischen Medizinischen Fachbereich ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht, noch die vorliegende oder eine andere Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Vellmar, den 19. Januar 2006

Katja Beinhorn