

Untersuchungen zur Rolle von Cyclooxygenase-2-gebildeten Prostaglandinen für die Bildung und Freisetzung von Renin

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)
der Naturwissenschaftlichen Fakultät IV
- Chemie und Pharmazie -
der Universität Regensburg



vorgelegt von
Corina Matzdorf
aus Berlin

2007

Die vorliegende Arbeit entstand in der Zeit von Februar 2004 bis Oktober 2007 unter der Leitung von Herrn PD Dr. Klaus Höcherl am Lehrstuhl für Pharmakologie und Toxikologie der Universität Regensburg.

Das Promotionsgesuch wurde eingereicht im Oktober 2007.

Tag der mündlichen Prüfung: 13.11.2007

Prüfungsausschuss:	Prof. Dr. S. Elz	(Vorsitzender)
	PD Dr. K. Höcherl	(Erstgutachter)
	Prof. Dr. A. Kurtz	(Zweitgutachter)
	Prof. Dr. J. Schlossmann	(Drittprüfer)

Für Thorsten

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn PD Dr. Klaus Höcherl für die Möglichkeit, meine Promotion an der Universität Regensburg unter seiner Anleitung durchführen zu können sowie die Überlassung des interessanten Themas. Seine engagierte persönliche Betreuung, stetige Diskussionsbereitschaft sowie tatkräftige Unterstützung bei der Durchführung der Tierversuche haben maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Herrn Prof. Dr. Frieder Kees danke ich herzlich für die kompetente Einführung in die Feinheiten der HPLC-Analytik, die Überlassung der HPLC-Anlagen und seine stete Diskussions- und Hilfsbereitschaft, die die Zeit in Regensburg unvergesslich machen werden.

Herrn Prof. Dr. Armin Kurtz danke ich für die vertrauensvolle Überlassung der Gerätschaften der Physiologie und das Interesse an meiner Arbeit.

Herrn PD Dr. Michael Bucher danke ich für die wissenschaftliche Diskussionsbereitschaft, praktische Hilfe bei medizinischen Fragestellungen sowie die Überlassung wertvoller Arbeitsgeräte und Substanzen.

Herrn Prof. Dr. Sigurd Elz danke ich für die Unterstützung, in der Zeit der Lehrstuhlvakanz diese Arbeit erstellen zu dürfen.

Herrn Prof. Dr. Seifert bin ich für die Möglichkeit, die praktischen Arbeiten an seinem Lehrstuhl beenden zu dürfen, zu Dank verpflichtet.

Besonders möchte ich mich bei Gertraud Wilberg, Ramona Mogge, Astrid Seefeld, Maria Hirblinger sowie Katharina Wohlfart bedanken, die mir praktische Unterstützung zukommen ließen, mich mit wertvollen Ratschlägen in die molekularbiologischen Arbeiten einführten und durch stete Anteilnahme ein hervorragendes Arbeitsklima schufen.

Meiner langjährigen Bürokollegin Frau Dr. Nina Lotter möchte ich für die ausgiebigen (wissenschaftlichen) Diskussionen, für ihre Freundschaft und Hilfsbereitschaft danken.

Allen bisher nicht erwähnten Kolleginnen und Kollegen an den Lehrstühlen Pharmakologie und Toxikologie, Physiologie I sowie Medizinische Chemie I danke ich für die gute Zusammenarbeit, Diskussionsbereitschaft, Anteilnahme und das gute Arbeitsklima an den Lehrstühlen.

Schließlich möchte ich mich ganz herzlich bei meinen Eltern bedanken, die mir Studium und Promotion ermöglichten und mir jederzeit den Rücken zur Verwirklichung meiner Pläne frei hielten. Meinem Mann Thorsten danke ich sehr für seine liebevolle und auch kritische Unterstützung, die mir zu jedem Zeitpunkt Kraft gegeben hat, sowie die Synthese von SC-58236 und SC-560 zur Überbrückung von Lieferengpässen.

INHALTSVERZEICHNIS

1	Einleitung.....	13
1.1	<i>Das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System.....</i>	<i>13</i>
1.2	<i>Bildung und Freisetzung von Renin.....</i>	<i>15</i>
1.3	<i>Regulationsmechanismen der Reninsekretion</i>	<i>16</i>
1.3.1	Der Macula densa-abhängige Signalweg.....	16
1.3.2	Der intrarenale Barorezeptor-Signalweg	19
1.3.3	Einfluss des sympathischen Nervensystems	20
1.3.4	Das negative Feedback.....	20
1.4	<i>Weitere lokale Hormone als Regulatoren des RAAS</i>	<i>21</i>
1.5	<i>Die Cyclooxygenase-2.....</i>	<i>22</i>
1.5.1	Biosynthese der Prostaglandine.....	22
1.5.2	Bedeutung der Prostaglandine für die Nierenfunktion.....	23
1.5.3	Lokalisierung und Struktur der COX-2.....	25
1.5.4	Die COX-2 in der Niere.....	26
1.5.5	Bedeutung der COX-2 für die Kontrolle des Renin-Systems.....	28
1.5.6	Selektive COX-2-Inhibitoren	29
2	Problemstellung.....	33
3	Material.....	34
3.1	<i>Chemikalien, Reagenzien und Pharmaka</i>	<i>34</i>
3.1.1	Chemikalien und Reagenzien.....	34
3.1.2	Pharmaka	36
3.2	<i>Verbrauchsmaterialien</i>	<i>38</i>
3.3	<i>Geräte.....</i>	<i>39</i>
3.4	<i>Kommerzielle Kits.....</i>	<i>41</i>

3.5	<i>Antikörper und Standards</i>	42
3.5.1	Antikörper	42
3.5.2	Größen- und Molekulargewichtsstandards	42
3.6	<i>Oligonukleotide</i>	42
3.6.1	Reverse Transkription	42
3.6.2	Primer für die PCR	43
3.7	<i>Puffer und Zubereitungen der Pharmaka</i>	44
3.7.1	Puffer für Arbeiten mit RNA und DNA	44
3.7.2	Puffer für die Western Blot Analyse	44
3.7.3	Zubereitungen der Pharmaka zur Applikation <i>in vivo</i>	46
3.8	<i>Versuchstiere</i>	46
4	Methoden	47
4.1	<i>Tierversuche</i>	47
4.1.1	Tierhaltung	47
4.1.2	Verabreichung der Pharmaka	48
4.1.3	Plethysmographische Blutdruckmessung	49
4.1.4	Messung des mittleren arteriellen Drucks	50
4.1.5	Gewinnung von Plasma und Organentnahme	50
4.1.6	Bestimmung der COX-2-Selektivität von SC-58236	50
4.2	<i>Bestimmung der Konzentration von SC-58236 im Rattenplasma</i> 51	
4.3	<i>Proteinbiochemische Methoden</i>	52
4.3.1	Proteinaufbereitung aus den Geweben	52
4.3.2	Bestimmung der Proteinkonzentration	53
4.3.3	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	53
4.3.4	Western Blot	53
4.3.5	Detektion der membrangebundenen Proteine durch Immunfärbung	54
4.3.6	Nachweis löslicher Proteine mit dem Enzym-Immunoassay	55
4.4	<i>Gentechnische Methoden</i>	56
4.4.1	Vorkehrungen bei Arbeiten mit RNA	56
4.4.2	Isolierung der Gesamt-RNA mit Trizol-Reagent®	57
4.4.3	Isolierung der Gesamt-RNA mit dem RNeasy-Kit	57

4.4.4	Bestimmung der RNA-Konzentration	58
4.4.5	Reverse Transkription	58
4.4.6	Quantitative PCR mit dem LightCycler®-System	59
4.4.7	Agarosegelelektrophorese.....	59
4.5	<i>Bestimmung der Plasmapareninaktivität.....</i>	60
4.6	<i>Statistik.....</i>	61
5	Ergebnisse.....	62
5.1	<i>Zeitabhängigkeit der Effekte des COX-2-Inhibitors SC-58236.....</i>	62
5.1.1	Plasmakonzentration von SC-58236	62
5.1.2	Expression der COX-1- und COX-2-mRNA im Nierencortex.....	63
5.1.3	Expression des COX-1- und COX-2-Proteins im Nierencortex	64
5.1.4	Konzentration von PGE ₂ in Nierencortex und Urin	65
5.1.5	Beeinflussung der Reninexpression und –freisetzung	67
5.1.6	Beeinflussung des systolischen Blutdrucks und der Herzfrequenz	69
5.1.7	Bestimmung der COX-2-Selektivität von SC-58236	69
5.2	<i>Einfluss von SC-58236 auf die Bildung und Freisetzung von Renin</i>	71
5.2.1	Einfluss von SC-58236 auf die Stimulation des Renin-Systems durch ACE- Inhibitoren und AT ₁ -Rezeptorantagonisten.....	71
5.2.1.1	Beeinflussung der Expression der COX-1- und COX-2-mRNA im Nierencortex	71
5.2.1.2	Beeinflussung der Konzentration von PGE ₂ im Nierencortex.....	72
5.2.1.3	Beeinflussung der Reninexpression und –freisetzung	73
5.2.1.4	Beeinflussung des systolischen Blutdrucks und der Herzfrequenz	75
5.2.2	Dosisabhängiger Effekt des COX-2-Inhibitors SC-58236 auf die Stimulation des Renin-Systems durch Candesartan	76
5.2.2.1	Plasmakonzentration von SC-58236	76
5.2.2.2	Beeinflussung der Expression der COX-1- und COX-2-mRNA im Nierencortex	76
5.2.2.3	Beeinflussung der Konzentration von PGE ₂ im Nierencortex.....	78
5.2.2.4	Beeinflussung der Reninexpression und –freisetzung	78
5.2.2.5	Beeinflussung des systolischen Blutdrucks und der Herzfrequenz	80
5.2.3	Einfluss von SC-58236 auf die salzabhängige Regulation des Renin- Systems.....	81
5.2.3.1	Beeinflussung der Expression der COX-1- und COX-2-mRNA im Nierencortex	81
5.2.3.2	Beeinflussung der Konzentration von PGE ₂ im Nierencortex.....	82
5.2.3.3	Beeinflussung der Reninexpression und –freisetzung	83
5.2.3.4	Beeinflussung des systolischen Blutdrucks und der Herzfrequenz	86

5.2.4	Einfluss von SC-58236 auf die Stimulation des Renin-Systems durch das Schleifendiuretikum Furosemid	87
5.2.4.1	Beeinflussung der Expression der COX-1- und COX-2-mRNA im Nierencortex	87
5.2.4.2	Beeinflussung der Konzentration von PGE ₂ im Nierencortex.....	88
5.2.4.3	Beeinflussung der Reninexpression und –freisetzung	89
5.2.4.4	Beeinflussung des systolischen Blutdrucks und der Herzfrequenz	91
5.2.5	Einfluss von SC-58236 auf die Aktivierung des Renin-Systems durch eine Nierenarterienstenose	92
5.2.5.1	Beeinflussung der Expression der COX-1- und COX-2-mRNA im Nierencortex	92
5.2.5.2	Beeinflussung der Expression des COX-1- und COX-2-Proteins im Nierencortex	93
5.2.5.3	Beeinflussung der Konzentration von PGE ₂ im Nierencortex.....	94
5.2.5.4	Beeinflussung der Reninexpression und –freisetzung	95
5.2.5.5	Beeinflussung des systolischen Blutdrucks und der Herzfrequenz	97
5.2.6	Einfluss von SC-58236 auf die β ₁ -Rezeptor-vermittelte Aktivierung des Renin-Systems	98
5.2.6.1	Beeinflussung der Expression der COX-1- und COX-2-mRNA im Nierencortex	98
5.2.6.2	Beeinflussung der Expression des COX-1- und COX-2-Proteins im Nierencortex	99
5.2.6.3	Beeinflussung der Konzentration von PGE ₂ im Nierencortex.....	100
5.2.6.4	Beeinflussung der Reninexpression und –freisetzung	101
5.2.6.5	Beeinflussung des systolischen Blutdrucks und der Herzfrequenz ...	102
5.3	<i>Einfluss von SC-58236 auf die Aktivierung des Renin-Systems durch Hydralazin.....</i>	104
5.3.1	Zeitabhängiger Effekt von Hydralazin auf das Renin-System	104
5.3.1.1	Beeinflussung des systolischen Blutdrucks und der Herzfrequenz ...	104
5.3.1.2	Expression der COX-1- und COX-2-mRNA im Nierencortex.....	105
5.3.1.3	Expression des COX-1- und COX-2-Proteins im Nierencortex	106
5.3.1.4	Konzentration von PGE ₂ im Nierencortex.....	107
5.3.1.5	Beeinflussung der Reninexpression und -freisetzung	108
5.3.2	Zeitabhängiger Effekt von SC-58236 auf die Reninregulation durch Hydralazin.....	110
5.3.2.1	Beeinflussung des systolischen Blutdrucks und der Herzfrequenz ...	110
5.3.2.2	Beeinflussung der Expression der COX-1- und COX-2-mRNA im Nierencortex	112
5.3.2.3	Beeinflussung der Konzentration von PGE ₂ im Nierencortex.....	113
5.3.2.4	Beeinflussung der Reninexpression und –freisetzung	113
5.3.3	Zeitabhängiger Einfluss von SC-58236 auf die Effekte einer akuten Applikation von Hydralazin	115
5.3.3.1	Effekt von SC-58236 auf den mittleren arteriellen Druck	115
5.3.3.2	Effekt von SC-58236 auf die Plasmareninaktivität	116
5.4	<i>Zusammenfassung der relativen Veränderungen der Renin-mRNA-Expression und der PRA.....</i>	118

5.5	<i>Einfluss des selektiven COX-1-Inhibitors SC-560 auf die Bildung und Freisetzung von Renin durch ausgewählte Modulatoren des Renin-Systems</i>	122
5.5.1	Effekte von SC-560 nach 7 Tagen	122
5.5.1.1	Plasmakonzentration von SC-560	122
5.5.1.2	Expression der COX-1- und COX-2-mRNA im Nierencortex.....	123
5.5.1.3	Konzentration von PGE ₂ in Nierencortex und Urin	123
5.5.1.4	Beeinflussung der Reninexpression und -freisetzung	124
5.5.1.5	Beeinflussung des systolischen Blutdrucks und der Herzfrequenz ...	125
5.5.2	Einfluss von SC-560 auf die Aktivierung des Renin-Systems durch ausgewählte Modulatoren	125
6	Diskussion	127
6.1	<i>Einfluss des selektiven COX-2-Inhibitors SC-58236 auf die Bildung und Freisetzung von Renin</i>	128
6.2	<i>Einfluss des selektiven COX-1-Inhibitors SC-560 auf die Bildung und Freisetzung von Renin</i>	140
7	Zusammenfassung	142
8	Literaturverzeichnis	144
9	Publikationen	158
10	Anhang	159

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
7-NI	7-Nitroindazol
A _{1A}	Adenosin-Rezeptor Subtyp 1A
Abb.	Abbildung
AC	Adenylylcyclase
AChE	Acetylcholinesterase
ACE	Angiotensin-Konversions-Enzym, <i>Angiotensin Converting Enzyme</i>
Ang-I	Angiotensin-I
Ang-II	Angiotensin-II
AT ₁	Angiotensin-II-Rezeptor Subtyp 1
AT ₂	Angiotensin-II Rezeptor Subtyp 2
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
BCA	<i>Bicinchonic acid</i>
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
cDNA	<i>copy</i> -Desoxyribonukleinsäure
COX-1	Cyclooxygenase-1
COX-2	Cyclooxygenase-2
d	Tage
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosid-5'-triphosphat
DP	PGD ₂ -Rezeptor
ECL	<i>enhanced chemiluminescence</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	<i>enzyme linked immunosorbent assay</i>
EMEA	<i>European Agency for the Evaluation of Medicinal Products</i>
EP	PGE ₂ -Rezeptor
Fa.	Firma
FDA	<i>Food and Drug Administration, USA</i>
FP	Prostaglandin F _{2α} -Rezeptor
g	Gramm
GFR	glomeruläre Filtrationsrate
h	Stunde
HF	Herzfrequenz
HPLC	Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie
HRP	<i>horseradish peroxidase</i> (Meerrettich-Peroxidase)

IC ₅₀	Konzentration, bei der 50 % der Enzymaktivität gehemmt wird
IgG	Immunglobulin G
IL	Interleukin
IM	innere Medulla
i. p.	intraperitoneal
IP	PGI ₂ -Rezeptor
IP ₃	Inositoltrisphosphat
i. v.	intravenös
JG-Zellen	juxtaglomeruläre Epitheloidzellen
JGA	juxtaglomerulärer Apparat
kDa	Kilodalton
kg	Kilogramm
KG	Körpergewicht
Konz.	Konzentration
L	Liter
LPS	Lipopolysaccharid
M	mol · L ⁻¹
m · m ⁻¹	Masseneinheit pro Masseneinheit
m · V ⁻¹	Masseneinheit pro Volumeneinheit
mA	Milliampere
MAD	mittlerer arterieller Druck
min	Minute
mmHg	Millimeter Quecksilber
M-MLV	<i>Murine-Moloney-Leukemia-Virus</i>
mRNA	<i>messenger RNA</i>
MW	Mittelwert
MW	<i>molecular weight</i>
n	Anzahl
n. d.	nicht detektierbar
NKCC2	Na ⁺ -K ⁺ -2Cl ⁻ -Cotransporter
nm	Nanometer
NO	Stickstoffmonoxid
NOS	NO-Synthase
NSAR	Nichtsteroidale Antirheumatika
OD	optische Dichte
OM	äußere Medulla
p	Irrtumswahrscheinlichkeit
PAF	Plättchen-aktivierender Faktor
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PGD ₂	Prostaglandin D ₂
PGDS	PGD-Synthase
PGE ₂	Prostaglandin E ₂
PGES	PGE-Synthase
PGF _{2α}	Prostaglandin F _{2α}

PGFS	PGF-Synthase
PGG ₂	Prostaglandin G ₂
PGH ₂	Prostaglandin H ₂
PGI ₂	Prostacyclin
PGIS	PGI-Synthase
PKC	Proteinkinase C
PLA ₂	Phospholipase A
PLC	Phospholipase C
p. o.	peroral
PRA	Plasmareninaktivität
r	Korrelationskoeffizient
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
RIA	Radioimmunoassay
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse-Transkriptase-PCR
s	Sekunde
sBP	systolischer Blutdruck
SD	<i>Sprague Dawley</i>
SDS	<i>Sodium dodecyl sulfate</i> (Natriumdodecylsulfat)
SEM	Standardfehler des Mittelwertes
SHR	spontan hypertensive Ratte
Tab.	Tabelle
Taq	<i>Thermophilus aquaticus</i>
TBE	Tris-Borat-EDTA
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung
TBS-T	Tris-gepufferte Salzlösung mit 0,05 % Tween 20
TGA	<i>Therapeutic Goods Administration</i> (Australien)
TNF	Tumornekrosefaktor
TP	TxA ₂ -Rezeptor
Tris	2-Amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propanediol
TxA ₂	Thromboxan A ₂
TxB ₂	Thromboxan B ₂
TxS	Thromboxan-Synthase
U	<i>Unit</i>
U · min ⁻¹	Umdrehungen pro Minute
UV	ultraviolett
V	Volt
V · V ⁻¹	Volumeneinheit pro Volumeneinheit
WKY	Wistar-Kyoto Ratte

1 Einleitung

1.1 Das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System

Das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS) ist ein wichtiges Regelsystem für den Blutdruck sowie den Salz- und Wasserhaushalt des Körpers. Angiotensin-II (Ang-II) ist der wichtigste biologische Effektor in diesem System. Der geschwindigkeitsbestimmende Schritt für die Bildung von Ang-II ist dabei die Freisetzung von Renin aus den juxtaglomerulären (JG) Epitheloidzellen der Niere in die Blutbahn. Diese Zellen sind in der Tunica Media der afferenten Arteriolen der Glomeruli lokalisiert. Die Aspartyl-Protease Renin spaltet aus dem hauptsächlich in der Leber gebildeten Angiotensinogen das inaktive Dekapeptid Angiotensin-I (Ang-I) ab. Die sich anschließende Umwandlung von Ang-I in das biologisch aktive Oktapeptid Angiotensin-II erfolgt sehr schnell durch die zinkhaltige Peptidase Angiotensin-Konversions-Enzym (Angiotensin-Converting-Enzyme, ACE), welche hauptsächlich in den Endothelzellen der Lunge und in der Bürstenzellmembran der Niere lokalisiert ist. ACE-Aktivität lässt sich auch im Plasma nachweisen. Ang-II vermittelt seine Effekte über G-Protein-gekoppelte Rezeptoren, die Angiotensin-II-Rezeptoren (AT). Die wichtigsten Effekte werden hierbei über den AT₁-Rezeptorsubtyp vermittelt. Die Aktivierung dieses Rezeptors bewirkt vorwiegend eine Stimulation der Phospholipase C (PLC), die über die Synthese von IP₃ nachfolgend die Freisetzung von Calcium-Ionen aus intrazellulären Speichern fördert. Über den AT₂-Rezeptorsubtyp ist derzeit nur wenig bekannt. Dieser wird v. a. in fetalem Gewebe exprimiert, aber auch im Gehirn, den Nebennieren sowie in den Ovarien und im Uterus. Ang-II wirkt über AT₁-Rezeptoren direkt vasokonstriktorisch, Natrium-retinierend und fördert die Synthese und Ausschüttung des Hormons Aldosteron aus der Nebennierenrinde, welches die Rückresorption von Natriumionen in der Niere verstärkt sowie die Exkretion von Kaliumionen erhöht. Die Aktivierung des RAAS führt effektiv zu einem Anstieg der extrazellulären Natriumkonzentration, einer Zunahme des extrazellulären Volumens

und zu einem Anstieg des systemischen Blutdrucks. Therapeutisch werden zur Senkung eines erhöhten arteriellen Blutdrucks ACE-Inhibitoren wie z. B. Captopril und Ramipril und AT₁-Rezeptorantagonisten wie Candesartan und Losartan eingesetzt. In diesem Jahr erfolgte die Zulassung des Renin-Inhibitors Aliskiren in den USA. Die deutsche Markteinführung fand nach positiver Bewertung des Zulassungsantrages durch das „Committee for Medicinal Products for Human“ am 1. September 2007 statt.

Zusätzlich zum zirkulierenden RAAS wurden auch lokale Renin-Systeme in diversen Geweben wie Gehirn, Herz, Nebenniere, Lunge, Leber und Gefäßen beschrieben (33, 110, 119). Hierbei werden wahrscheinlich alle Komponenten des RAAS in den Zellen selbst gebildet (29). Wo dies nicht möglich ist, wird vermutlich zirkulierendes Renin oder auch Angiotensinogen für die lokale Ang-II-Synthese herangezogen. Das lokale RAAS wird für verschiedene pathophysiologische Veränderungen verantwortlich gemacht wie z. B. die Hypertrophie des Herzens (120, 154). Es reguliert hier allerdings auch die Kontraktilität der Myozyten sowie die Pumpfunktion des Herzens (30).

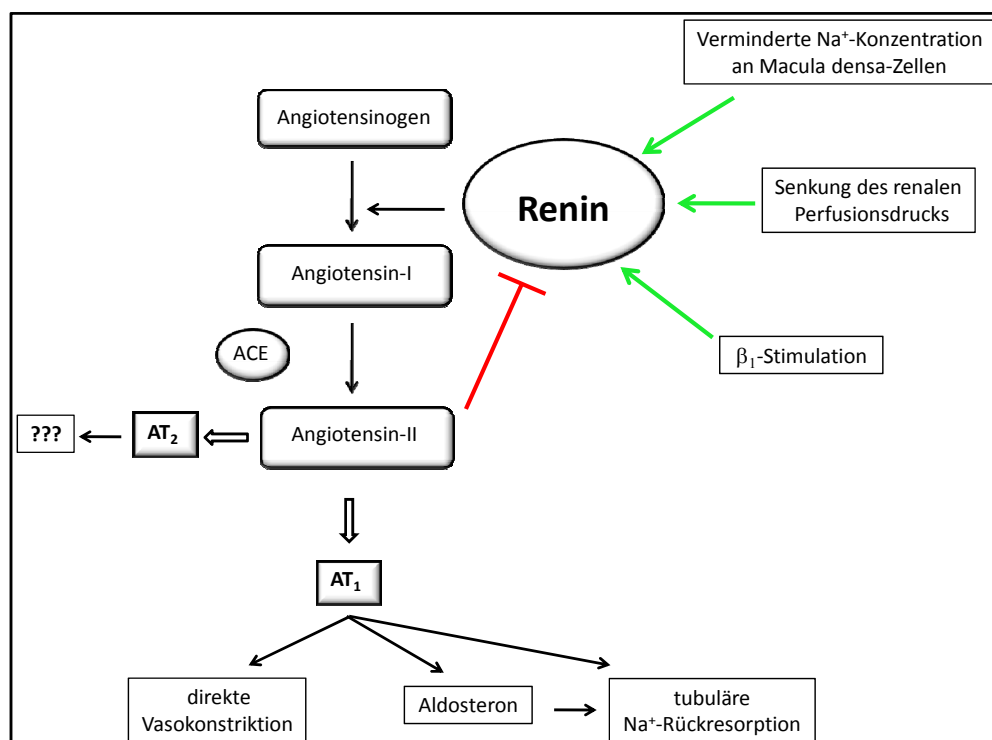


Abb. 1: Schematische Darstellung des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems und dessen Regulatoren.

1.2 Bildung und Freisetzung von Renin

Die renale Reninsynthese erfolgt in den JG-Zellen, die möglicherweise durch metaplastische Transformation aus glatten Gefäßmuskelzellen hervorgehen. Sie enthalten in granulären Vesikeln unterschiedlicher äußerer Form das Enzym Renin. Die Anzahl reninproduzierender Zellen kann bei chronischer Stimulation des RAAS mittels eines noch nicht geklärten Mechanismus erhöht werden, wobei in den afferenten Arteriolen eine zusätzliche Umwandlung glatter Muskelzellen in reninbildende Zellen erfolgt. Die Translation von Renin erfolgt aus der Renin-mRNA als Präprorenin (4, 138). Unter Abspaltung eines Signalpeptids erfolgt die Translokation in das endoplasmatische Retikulum der Zelle, wo die Bildung des enzymatisch inaktiven Prorenins stattfindet (42, 96, 97). Prorenin kann entweder direkt in die Blutbahn sezerniert oder nach Glykosylierung in den sekretorischen Vesikeln gespeichert werden. Das Anhängen eines Mannose-6-Phosphat-Restes ist dabei nicht nur für die Verpackung des Renins in die Vesikel sondern auch für die Vesikelbildung selbst vonnöten (28). Die Freisetzung des enzymatisch aktiven Renins erfolgt nach N-terminaler Verkürzung des Prorenins in den Vesikeln. Das hierfür verantwortliche Enzym konnte bisher noch nicht näher charakterisiert werden (20, 34, 53). Zahlreiche Befunde sprechen für eine diskontinuierliche Freisetzung des Renins aus der Zelle mittels Exocytose (134). Änderungen der Osmolarität beeinflussen die Freisetzungsrates, wobei eine gesenkte extrazelluläre Osmolarität zu einem Anschwellen der Renin-Vesikel mit nachfolgender Fusion der Plasmamembran führt, und somit zu einer Erhöhung der Sekretion (133). Weiterhin könnte auf mechanischem Wege die Aktivierung der Myosin-Leichtketten-Kinase mit gleichzeitiger Kontraktion der JG-Zelle zu einer Behinderung der Vesikelfusion mit der Plasmamembran führen und somit die Reninfreisetzung vermindern (102, 103).

1.3 Regulationsmechanismen der Reninsekretion

Die Regulation der Reninsekretion erfolgt über ein komplexes Zusammenspiel von verschiedenen Mechanismen: den Macula densa-abhängigen Signalweg, den intrarenalen Barorezeptor-Signalweg sowie das sympathische Nervensystem. Desweiteren ist ein negativer Feedback-Mechanismus beteiligt (11).

1.3.1 Der Macula densa-abhängige Signalweg

Die Macula densa-Zellen sind eine Ansammlung spezialisierter Zellen des distalen Tubulus. Sie sind Bestandteil des juxtaglomerulären Apparates (JGA) und stehen in direktem Kontakt mit den reninbildenden Epitheloidzellen der afferenten Arteriole der gleichen Nephroneneinheit. Macula densa-Zellen nehmen die Funktionen eines Sensors sowie der Informationsübertragung zur afferenten Arteriole wahr. Es wird angenommen, dass sie Veränderungen der NaCl-Konzentration auf der luminalen Seite detektieren können. Eine zu geringe Salzkonzentration führt dabei letztendlich zu einer vermehrten Sezernierung von Renin ins Plasma, während eine erhöhte Salzkonzentration diese hemmt. Die Detektion der Salzkonzentration erfolgt über den $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-2Cl}^-$ -Cotransporter (NKCC2) (122), wobei die Konzentration von Chlorid, welches eine geringere Affinität im Vergleich zu den anderen beiden Ionen zum Transporter aufweist, die Regelgröße zu sein scheint (89). Die sich anschließenden Signalwege sind bisher nicht sicher identifiziert worden. Hierbei wird die Beteiligung lokaler Hormone wie Adenosin, Stickstoffmonoxid (NO) und Prostaglandine (PG) wie PGE_2 und Prostacyclin (PGI_2) diskutiert (107) (Abb. 2).

Da durch erhöhte Salzkonzentrationen vermehrt ATP in den Macula densa-Zellen freigesetzt (6) und zu Adenosin abgebaut wird (140), wurde vermutet, dass eine erhöhte Adenosinkonzentration an der afferenten Arteriole nicht nur zu einer direkten Vasokonstriktion sondern auch zu einer Hemmung der Reninsekretion über Adenosin 1 A ($\text{A}_{1\text{A}}$)-Rezeptoren führen könnte (107). Neuere Untersuchungen an $\text{A}_{1\text{A}}$ -Rezeptor-Knock-out-Mäusen zeigen jedoch, dass die salzabhängige Regulation der Reninexpression in vollem Umfang erhalten bleibt, so dass eine Beteiligung von

Adenosin im Macula densa-abhängigen Reaktionspfad höchstens eine untergeordnete Rolle spielen dürfte (129).

NO wird im JGA durch die endotheliale NO-Synthase (eNOS) in der afferenten Arteriole (9) sowie durch die in den Macula densa-Zellen exprimierte neuronale NOS (nNOS) synthetisiert (98, 152). Eine verminderte Salzzufuhr sowie die Applikation von Schleifendiuretika stimulieren parallel die Expression der nNOS und des Renins (9). Da NO die Reninsekretion direkt stimuliert und eine unselektive NOS-Hemmung die Macula densa-abhängige Stimulation des RAAS beeinflusst (82, 126), wurde vermutet, dass NO als Signalmolekül zwischen Macula densa- und JG-Zellen wirkt. Der Effekt eines präferenziellen nNOS-Inhibitors (7-NI) brachte jedoch in Ratten und Mäusen widersprüchliche Ergebnisse bei Stimulation des RAAS mittels Nidrigsalzdiät hervor (5, 148). Neuere Befunde an eNOS- und nNOS-Knock-out-Mäusen zeigen, dass zwar eine basale Senkung der Reninsekretion auftritt, diese jedoch durch das Schleifendiuretikum Bumetanid, welches den NKCC2 hemmt, weiterhin stimulierbar ist. Außerdem wurde nachgewiesen, dass nach unselektiver NOS-Hemmung in der isoliert perfundierten Niere die Stimulation des RAAS intakt ist, wenn eine definierte Menge NO zugeführt wird (17). Diese Daten sprechen für einen modulierenden Effekt von NO, unabhängig von seiner Bildungsquelle.

Die Wirkung von PGE₂ wird in Kapitel 1.5 näher beschrieben.

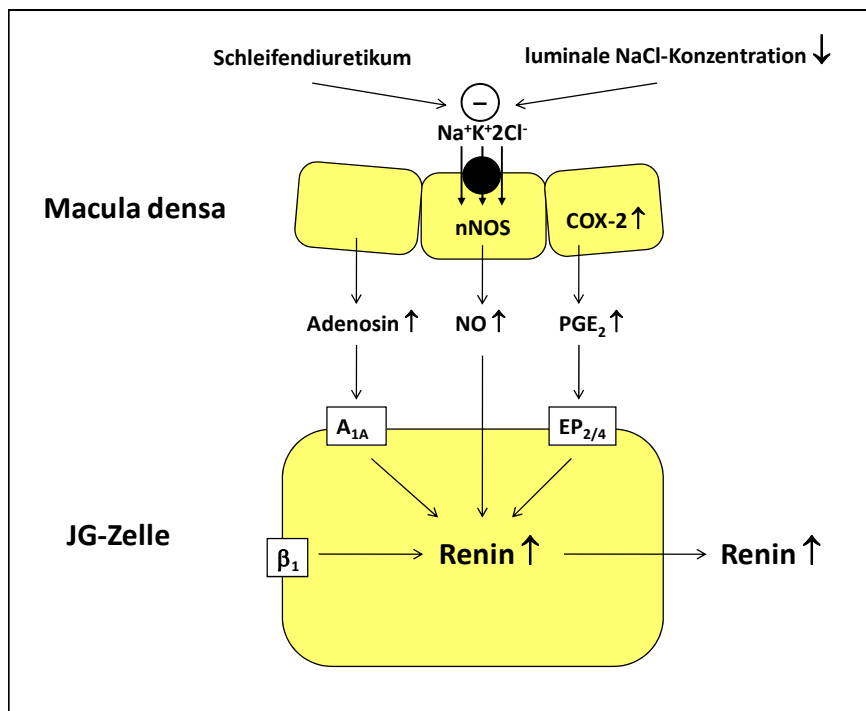


Abb. 2: Mögliche Bedeutung von Adenosin, NO und PGE_2 für die Macula densa-abhängige Kontrolle der Reninsekretion

In den Macula densa-abhängigen Reaktionspfad kann im Tierversuch durch verschieden konzentrierte Salzdiäten eingegriffen werden. So führt eine einwöchige Nidrigsalzdiät zu einem Anstieg der Reninexpression und -freisetzung gegenüber Normalsalzdiät, während eine Hochsalzdiät eine verminderte Reninantwort zur Folge hat (59). Desweiteren kann durch das Schleifendiuretikum Furosemid der NKCC2 pharmakologisch gehemmt werden, was zu einer Senkung des Salztransports in die Macula densa-Zellen führt und somit einen Anstieg der Reninexpression und -freisetzung zur Folge hat (49).

1.3.2 Der intrarenale Barorezeptor-Signalweg

Der renale Perfusionsdruck wird durch den systemischen Blutdruck beeinflusst. Fällt dieser ab, kommt es zu einer verstärkten Reninexpression und –freisetzung, umgekehrt verhält es sich bei einem Blutdruckanstieg (138). Da diese Regulation auch in isoliert perfundierten Nieren erhalten ist, wird ein Barorezeptor in den präglomerulären Gefäßen postuliert (124). Hierbei wird zum einen die Beteiligung dehnungsensitiver Ionenkanäle vermutet (14), zum anderen könnten Prostaglandine eine Rolle bei der Stimulation des RAAS spielen (151).

Der renale Perfusionsdruck sinkt z. B. auch bei einer Nierenarterienstenose, welche im Tierversuch durch die Verengung der linken Nierenarterie hervorgerufen werden kann. Hierbei wird eine Metallklammer (Klip) über die Nierenarterie geschoben, die die Nierenarterie an dieser Stelle auf einen definierten Durchmesser einengt, wodurch es in dieser Niere zu einer verminderten Durchblutung kommt. Dies führt wiederum zu einem Anstieg der Reninexpression und –freisetzung in der entsprechenden Niere (91), wodurch der systemische Blutdruck angehoben wird.

Pharmakologisch kann eine Blutdrucksenkung z. B. durch Hydralazin erzeugt werden. Hydralazin führt über einen bisher unbekanntem Mechanismus zu einer direkten Relaxation der glatten Muskulatur an Arteriolen, wobei es zu einer Senkung der intrazellulären Calciumkonzentration zu kommen scheint (1). Gegenreflektorisch wird bei der Verabreichung von Hydralazin der Sympathikus aktiviert, wodurch es zu einer Freisetzung von Noradrenalin kommt (64).

Der direkte Einfluss des intrarenalen Drucks auf die Stimulation des RAAS kann weiterhin in der isoliert perfundierten Niere untersucht werden.

1.3.3 Einfluss des sympathischen Nervensystems

Die Stimulation sympathischer Nerven in der Niere führt zu einer Aktivierung des RAAS. In der Niere werden die postganglionären sympathischen Nervenendigungen in enger Nachbarschaft zu den JG-Zellen gefunden, die wiederum den β_1 – adrenergen Rezeptor exprimieren. Freigesetztes Noradrenalin führt über die Aktivierung dieses Rezeptors auf den JG-Zellen zu einer Aktivitätssteigerung der Adenylylcyclase und somit zu einem Anstieg von intrazellulärem cAMP, wodurch die Reninexpression und -freisetzung stimuliert werden (62, 63).

Pharmakologisch kann die Stimulation des RAAS durch die Gabe von Isoprenalin, einem unselektiven β_1/β_2 – Rezeptoragonisten, erreicht werden. Andererseits hemmt die Applikation eines β – Rezeptorantagonisten wie z. B. des nicht selektiven Propranolols die Reninfreisetzung aus den JG-Zellen.

1.3.4 Das negative Feedback

Angiotensin-II selbst kann direkt über die Aktivierung des AT_1 -Rezeptors die Synthese und Freisetzung von Renin in den JG-Zellen hemmen. Hierbei wird eine PLC aktiviert, die durch Erhöhung der Calciumkonzentration über die Proteinkinase C (PKC) seine RAAS hemmende Wirkung vermittelt (80, 81). Auch eine Involvierung von Prostaglandinen kann nicht ausgeschlossen werden (125).

Die inhibitorische Wirkung von Ang-II zeigt sich auch durch die verstärkte Reninexpression und -freisetzung nach Applikation von ACE-Inhibitoren wie Captopril (69) und Ramipril (16) sowie AT_1 -Rezeptorantagonisten wie z. B. Candesartan (149). Da durch diese Behandlungen der Blutdruck stark gesenkt wird, ist eine Beteiligung dessen an der Reninregulation nicht vollständig auszuschließen. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass bei linksseitiger Nierenarterienstenose mit gleichzeitiger Applikation des AT_1 -Rezeptorantagonisten Losartan trotz Normalisierung des Blutdrucks gleiche Renin-mRNA-Abundanz in der kontralateralen Niere bestimmt werden konnte wie bei Losartan-Applikation allein (130). Somit scheint die Hemmung des Renin-Systems durch den AT_1 -Rezeptorantagonisten unabhängig von der durch Losartan erzeugten Hypotonie zu sein.

1.4 Weitere lokale Hormone als Regulatoren des RAAS

Es sind bis heute zahlreiche weitere Effektoren bekannt, die die Reninexpression und -sekretion beeinflussen. Stimulatoren des RAAS sind dabei vasodilatierende Substanzen wie Bradykinin, Dopamin, NO sowie Prostaglandine (68, 71). Gegenteiligen Effekt zeigen vasokonstriktorische Substanzen wie Adenosin, Arginin-Vasopressin, Endothelin und der Plättchen-aktivierende Faktor (PAF) (71, 93, 109, 114).

Da Prostaglandine in vielen Zelltypen in direkter Nachbarschaft zu den JG-Zellen gebildet werden, wurden in den letzten Jahrzehnten zahlreiche Untersuchungen zur Wirkung dieser Botenstoffe auf die Nierenfunktion und besonders auf das RAAS durchgeführt. Vor allem mit der Entdeckung eines zweiten Cyclooxygenase-Isoenzym, welches konstitutiv und regulierbar in der Niere exprimiert wird, wird die Frage nach der physiologischen Funktion der Prostaglandine immer interessanter.

1.5 Die Cyclooxygenase-2

1.5.1 Biosynthese der Prostaglandine

Die Synthese der Prostaglandine aus Arachidonsäure wird durch die Aktivität des Enzyms Cyclooxygenase (COX) (135), einem bifunktionellen Enzym, bestehend aus Prostaglandin G- und Prostaglandin H-Synthase, bestimmt. Arachidonsäure wird zunächst durch die Phospholipase A₂ (PLA₂) hydrolytisch aus Phospholipiden der Zellmembran freigesetzt. Anschließend bindet die Arachidonsäure an die Dioxygenase-aktive Seite des Enzyms, wo die Umsetzung zum PGG₂ stattfindet. Da hierbei ein Ringschluss und eine Oxygenierung stattfinden, ist dieser Reaktionsschritt mit der Cyclooxygenase-Reaktion gleichzusetzen. Dem schließt sich die schnelle Peroxidasereaktion an, bei der PGH₂ gebildet wird. Aus PGH₂ können im Anschluss durch colokalisierte, spezifische Synthasen biologisch aktive Prostaglandine gebildet werden, wie z. B. PGE₂, PGI₂, PGD₂, PGF_{2α} und Thromboxan (Tx) A₂. Diese Gewebeshormone werden nicht vesikulär gespeichert, weshalb nach der Synthese eine direkte Freisetzung aus der Zelle über spezifische Transporter erfolgt (127). Ihre Wirkung vermitteln die Prostaglandine über spezifische G-Protein gekoppelte Rezeptoren (EP₁₋₄ für PGE₂, IP für PGI₂, TP für TxA₂, FP für PGF_{2α}, DP für PGD₂) (Abb. 3). Über das komplexe Zusammenspiel der Prostaglandine wird eine Vielzahl von Prozessen im Körper reguliert. Dazu zählen die Vasoaktivität von Gefäßen, die Nierendurchblutung, Thrombozytenaggregation, Bronchokonstriktion bzw -dilatation, die Vermittlung von Schmerzen und Fieber, die Modulation von Immunantworten, die Produktion von Säure und Schleim im Magen sowie Funktionen im ovariellen Zyklus.

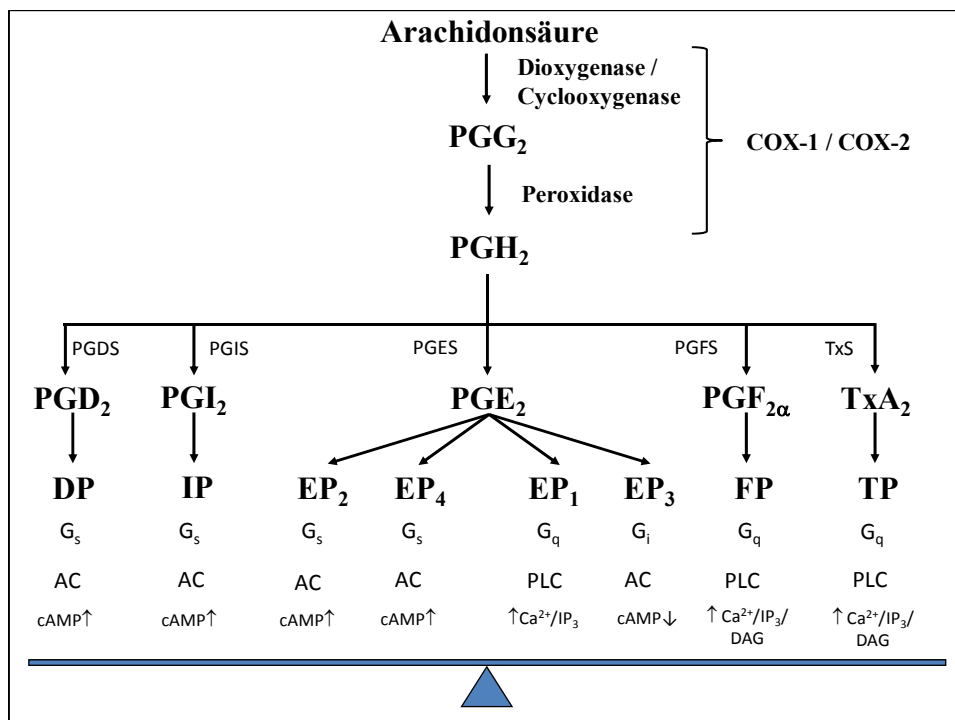


Abb. 3: Schematische Darstellung der Synthese von und Signaltransduktion durch Prostaglandine. Das bifunktionelle Enzym, bestehend aus PGG-Synthase und PGH-Synthase, wird als Cyclooxygenase bezeichnet.

1.5.2 Bedeutung der Prostaglandine für die Nierenfunktion

In den 1930er Jahren charakterisierten der schwedische Wissenschaftler von Euler und der englische Wissenschaftler Goldblatt eine uteruskontrahierende Substanz in Samenzellen, die später als Prostaglandin bezeichnet wurde (39, 147). Erst in den 60er Jahren konnten Samuelsson und Bergström die Struktur und Biosynthese von Prostaglandinen aufklären. Diese Gewebeshormone sind für vielfältige physiologische Regulationen im Körper verantwortlich, wobei nicht nur die bekannte Beteiligung an Entzündungsvorgängen zu nennen ist, sondern auch ihre Wirkungen auf die Magenschleimhaut, die Muskulatur sowie auf Gefäße, die sowohl Vasokonstriktion, Vasodilatation als auch eine verstärkte Gefäßpermeabilität beinhalten.

Hauptprodukt des Prostaglandinstoffwechsels in der Niere ist PGE₂, welches vor allem im Nierenmark zu finden ist, mit etwas geringerer Ausprägung aber auch im Nierencortex (8). Die Konzentration an PGI₂ ist in beiden Geweben geringer als die an

PGE₂. Beide Prostaglandine wirken in der Niere als Vasodilatoren. Das in der Niere nur wenig gebildete TxA₂ hingegen gilt als Vasokonstriktor (67). Diese Prostaglandine sind für die Aufrechterhaltung des renalen Blutflusses sowie der glomerulären Filtrationsrate (GFR) verantwortlich, indem sie unter anderem die vasokonstriktorische Wirkung von Ang-II, Catecholaminen und Vasopressin bei Erkrankungen wie Bluthochdruck, Diabetes mellitus, Hypovolämie, Leberzirrhose sowie Herzinsuffizienz abpuffern (123). PGE₂ vermittelt diese Wirkungen über die G_s-gekoppelten Rezeptoren EP₂ und EP₄ (128).

Desweiteren konnte durch intrarenale Applikation von PGE₂ bzw. dem Analogon Viprostol eine verstärkte Natriurese und Diurese hervorgerufen werden (38). Untersuchungen zeigten, dass sowohl die Salzresorption im corticalen dicken aufsteigenden Ast der Henle-Schleife als auch die Salz- und Wasserresorption im Sammelrohr durch PGE₂ gehemmt wird (117, 144). Außerdem wurde unter COX-Hemmung die Natriumsekretion durch Infusion von PGE₂, nicht aber durch Infusion von PGI₂ wiederhergestellt. Sehr wahrscheinlich ist auch die verminderte Wirkung von Diuretika unter Therapie mit Cyclooxygenase-Hemmstoffen auf diesen Mechanismus zurückzuführen.

Die direkte Stimulation der Reninexpression und -freisetzung durch PGE₂ sowie PGI₂ wird durch zahlreiche Untersuchungen belegt. Hierbei kommt es wahrscheinlich über die Aktivierung von EP₂-, EP₄- und IP-Rezeptoren zu einem Anstieg der cAMP-Konzentration in den JG-Zellen (37, 68, 128). Außerdem gibt es Anzeichen dafür, dass beide Prostaglandine mögliche Signalmoleküle für die bereits unter 1.3 beschriebenen Regulationsmechanismen des RAAS sein könnten.

Bevor COX-2-selektive Substanzen erhältlich waren, wurde die Funktion der Prostaglandine in der Niere mittels unspezifischer Inhibitoren, den nichtsteroidalen Antirheumatika (NSAR), untersucht. In verschiedenen Tierversuchen konnte gezeigt werden, dass z. B. Indomethacin als unselektiver COX-Inhibitor den Anstieg der Plasmapreninaktivität (PRA) nach Stimulation mit einer Niedrigsalzdiät oder nach suprarenalem Verschluss der Aorta hemmt (35, 37). Ebenso wurde in der isoliert perfundierten Niere eine Hemmung der Druck- sowie Chlorid-abhängigen

Reninfreisetzung gefunden (87). Auch in der therapeutischen Praxis treten einige nachteilige Effekte bei der Behandlung mit NSAR auf, zu denen zum einen eine verstärkte Salz- und Wasserretention, zum anderen eine abschwächende Wirkung auf die Therapie mit Diuretika bzw. Antihypertensiva zählen.

1.5.3 Lokalisierung und Struktur der COX-2

Die COX-1 wurde erstmals 1976 gereinigt und 1988 kloniert (31). Man vermutete allerdings damals bereits, dass die Bildung von Prostaglandinen bei entzündlichen Prozessen hauptsächlich über ein weiteres Enzym erfolgt. Jedoch konnte erst 1991 eine induzierbare Isoform der COX kloniert werden, die heute als COX-2 bezeichnet wird (79, 153). Die Induktion der COX-2 kann durch Zytokine, wie z. B. den Tumornekrosefaktor (TNF) α , Interleukin (IL)-1, IL-6, IL-8, bakterielle Lipopolysaccharide (LPS), aber auch durch Endothelin, Ang-II sowie Noradrenalin angeregt werden (136). Inzwischen ist bekannt, dass die COX-2 konstitutiv auch im Gehirn, im Rückenmark, dem Uterus, der Plazenta sowie in der Niere gebildet wird (10, 131).

Weil die COX-Isoenzyme in ihrer Aminosäuresequenz eine Homologie von etwa 60 % aufweisen, sind der Mechanismus ihrer Reaktionskatalyse sowie ihrer Inaktivierung nahezu identisch. Außerdem sind organspezifisch verschiedene Splicevarianten gefunden worden, deren Funktionen aber noch unklar sind. In vielen Zellorganellen findet eine Coexpression beider Cyclooxygenasen statt. Häufig sind diese jedoch an verschiedene nachfolgende Synthesen gekoppelt. So ist die cytosolische PGE-Synthase (PGES) v. a. in Nachbarschaft der COX-1 zu finden, während die mikrosomalen PGE-Synthesen 1 und 2 in erster Linie mit der COX-2 colokalisiert sind (99). Weiterhin ist die hydrophobe Tasche der COX-2 größer als die der COX-1, was für die selektive Wirkung einiger COX-2-Inhibitoren verantwortlich gemacht wird.

1.5.4 Die COX-2 in der Niere

Unterschiede zwischen den beiden Cyclooxygenasen sind nicht nur in ihrer Struktur und Kopplung zu finden, sondern auch in ihrer Lokalisation in der Niere. So wird die COX-1 in der Niere in Arterien, Arteriolen, Glomeruli und am stärksten in Sammelrohrzellen konstitutiv exprimiert. In der Regel wird die Expressionsrate der COX-1 im Nierencortex nicht verändert, während durch die Applikation von LPS (65), Schleifendiuretika (19) oder durch eine Niedrigsalzdiät die Expressionsrate in der Medulla vermindert werden kann (67). Die COX-2 wird in der Niere v. a. in den interstitiellen Zellen des Nierenmarks und der Pars recta des distalen Tubulus, einschließlich der Macula densa-Region, aber auch in prä- und postglomerulären Gefäßen, der Vasa recta sowie in einigen Spezies in den Sammelrohrzellen exprimiert (72, 77) (Abb. 4).

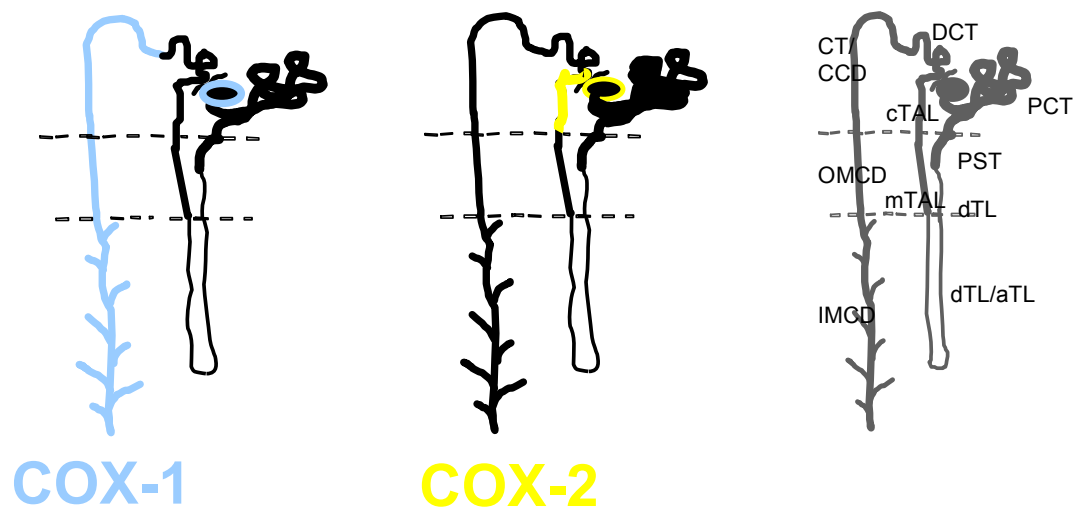


Abb. 4: Lokalisation der COX-1 und COX-2 im Nephron einer Ratte nach (146).

Die Vermutung, dass die COX-2 neben der Bildung proinflammatorischer Prostaglandine hier noch eine andere Funktion hat, konnte durch Untersuchungen an entsprechenden Knock-out-Mäusen gezeigt werden. Es stellte sich heraus, dass die

Deletion der COX-2 zu pathophysiologischen Veränderungen der Niere führt, die mit einer erhöhten Mortalität verbunden sind (32, 86, 95, 101).

Die Expression der COX-2 wird sowohl in der Nierenrinde als auch im Nierenmark reguliert. So ist bekannt, dass Diäten mit verschiedenen Salzkonzentrationen die COX-2-Expression in der Rattenniere beeinflussen. Hierbei wirkt eine Nidrigsalzdiät stimulierend, eine Hochsalzdiät hemmend auf die Genexpression der COX-2 und auch auf die Bildung von PGE₂ im Nierencortex (47, 59, 68, 108). Gegensinnig wird die COX-2 unter Nidrigsalzdiät im Nierenmark reguliert (158). Auch die Hemmung des negativen Feedbacks des RAAS mittels ACE-Inhibitoren und AT₁-Rezeptorantagonisten führt zu einem Anstieg der COX-2 im Nierencortex (24), während eine Infusion von Ang-II zu einem Abfall der mRNA-Expression führt. Bei einer Kombination aus Nidrigsalzdiät und ACE-Inhibition wird die Expression additiv verstärkt, was zur Folge hat, dass in der Immunhistologie ein Großteil der glomerulären Macula densa-Zellen COX-2 positiv reagiert (22). Die Applikation eines Schleifendiuretikums führt ebenso zum Anstieg der COX-2-Expression (92) wie die Gabe von Amilorid, Dopamin, Thiazid-Diuretika (161) oder eine Senkung des renalen Perfusionsdruckes mittels Stenose der linken Nierenarterie (91). Auch Diabetes mellitus (74), Bartter-Syndrom (75) und Leberzirrhose (88) oder LPS (65) sind positive Regulatoren der COX-2-Expression in der Nierenrinde. Im Gegensatz dazu senken Mineralo- und Glucocorticoide die Expressionsraten im Nierencortex (160), wohingegen für Mineralocorticoide eine stimulierende Wirkung im Nierenmark gefunden wurde (159). *In-vitro*-Untersuchungen mit Dexamethason zeigen, dass die Verminderung der COX-2-mRNA eine Folge der Destabilisierung dieser sein könnte (113). Die Immunsuppressiva Ciclosporin A, Tacrolimus und Everolimus senken ebenso die Expression von COX-2-mRNA und -Protein im Nierencortex, mit Ausnahme von Everolimus auch in der Medulla (55, 57).

1.5.5 Bedeutung der COX-2 für die Kontrolle des Renin-Systems

In immunhistochemischen Untersuchungen wurde gezeigt, dass die COX-2 in den Macula densa-Zellen in enger Nachbarschaft zu den reninproduzierenden JG-Zellen exprimiert wird (Abb. 5).

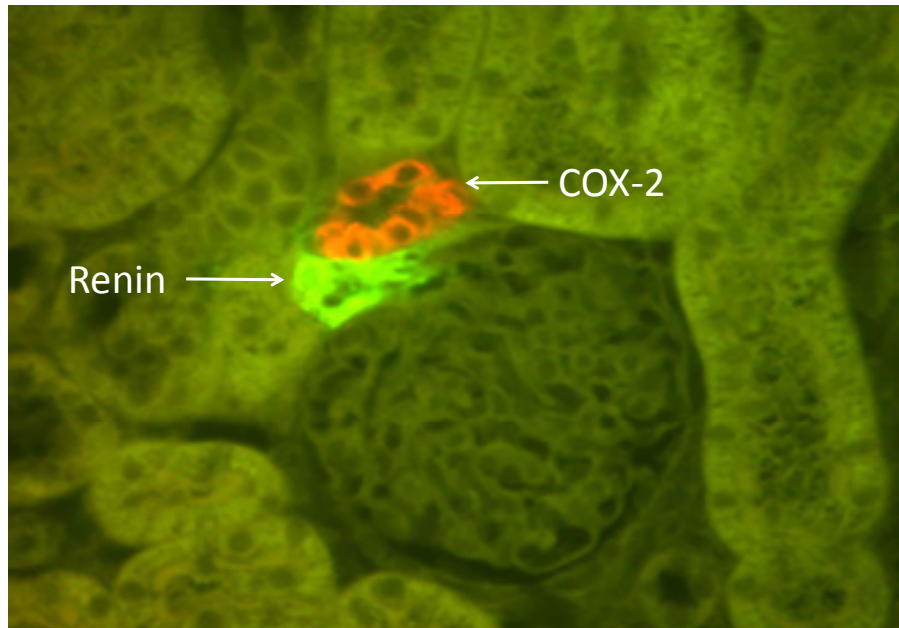


Abb. 5: Colokalisation von COX-2 und Renin in Macula densa- und juxtaglomerulären Zellen. Die Ratte wurde mit einer Nidrigsalzdiät in Kombination mit Ramipril-Applikation für eine Woche behandelt. Diese Abbildung wurde von Charlotte Wagner, Institut für Physiologie, Universität Regensburg, zur Verfügung gestellt.

Auffällig ist weiterhin, dass viele Stimulatoren, die die Renin-mRNA-Expression sowie die PRA erhöhen, gleichzeitig die Expressionsrate der COX-2-mRNA verstärken. Dazu zählen Nidrigsalzdiät, Schleifendiuretika, verminderter renaler Perfusionsdruck sowie ACE-Inhibitoren und AT_1 -Rezeptorantagonisten (44). Bei Nidrigsalzdiät und Schleifendiuretika-Applikation wird auch für die erhöhte COX-2-mRNA-Expression - wie für die gesteigerten Reninparameter - die verminderte Salztransportrate in den Macula densa-Zellen verantwortlich gemacht (23, 92, 157). Aufgrund dieser Ergebnisse und unter Berücksichtigung der Effekte von PGE_2 auf das Renin-System (siehe 1.5.2)

scheinen COX-2-gebildete Prostaglandine wichtige Signalmoleküle für die Macula densa-abhängige Reninregulation in JG-Zellen zu sein.

Untersuchungen mit selektiven COX-2-Inhibitoren und mit COX-2-Knock-out-Mäusen zeigen jedoch zum Teil widersprüchliche Ergebnisse. Einige Arbeitsgruppen konnten in Untersuchungen mit den selektiven COX-2-Inhibitoren SC-58236 und SC-58125 sowie an COX-2-defizitären Mäusen zeigen, dass ohne COX-2-gebildete Prostaglandine nur eine abgeschwächte oder sogar keine Stimulation des RAAS durch renovaskuläre Hypertension, Nidrigsalzdiät, ACE-Hemmung und AT₁-Rezeptorblockade stattfindet (24, 25, 36, 151, 155). Dem stehen Untersuchungen mit den für therapeutische Zwecke kommerziell erhältlichen COX-2-Inhibitoren Celecoxib und Rofecoxib gegenüber, für die eine Verminderung der Reninantwort auf dieselben Stimuli nicht festgestellt werden konnte (48, 59, 61, 91, 112, 115).

1.5.6 Selektive COX-2-Inhibitoren

Erst 1971 konnte Vane nachweisen, dass sowohl Acetylsalicylsäure, deren antiinflammatorische Wirkung bereits seit 1899 bekannt war, als auch Indomethacin ihre schmerzlindernde Wirkung über die Hemmung der Prostaglandinsynthese hervorrufen (142). Durch die verminderte Synthese von PGE₂ und PGI₂ ließen sich erstmals auch die Nebenwirkungen wie Ulcera und Nierenfunktionsstörungen, dieser Arzneistoffklasse erklären, da PGI₂ die Durchblutung des Magens sowie COX-1-gebildetes PGE₂ die Schleimsekretion fördern und beide Prostaglandine auch für die Regulation der Nierendurchblutung nötig sind. Da die COX-2 überwiegend in entzündeten Geweben verstärkt exprimiert wird, während die Expressionsrate der COX-1 weitgehend unbeeinflusst bleibt, wurde die Hypothese aufgestellt, dass eine selektive Hemmung der COX-2 zur Entzündungshemmung ohne die durch eine Hemmung der COX-1 verursachten typischen Nebenwirkungen führen müsste (143). Wie allerdings bereits beschrieben, hat die COX-2 nicht allein proinflammatorische Wirkung.

Nach Aufklärung der Biosynthesewege der Prostaglandine wurde klar, dass der Angriffspunkt der COX-Hemmstoffe an der PGG-Synthase lokalisiert ist. Diese

unterscheidet sich in den COX-Isoenzymen in ihrer Struktur und Größe (83, 90). Es wird postuliert, dass auf diesen Differenzen die unterschiedliche Selektivität der verschiedenen COX-Inhibitoren beruht. Zur Bestimmung der Selektivität einzelner Substanzen wird heute insbesondere der Vollblutassay verwendet. Dazu wird humanes Vollblut mit dem Inhibitor gemischt und in zwei Ansätzen und über einen definierten Zeitraum dem Gerinnungsprozess oder einer inflammatorischen Reaktion mittels LPS-Zugabe ausgesetzt. Hierbei wird ausgenutzt, dass Thrombozyten zu mindestens 99 % COX-1 exprimieren, über die während der Plättchenaggregation TxA_2 freigesetzt wird, während Monozyten nach LPS-Inkubation verstärkt COX-2 exprimieren und PGE_2 ausschütten. Während die meisten älteren COX-Inhibitoren (NSAR) in diesem System beide Isoenzyme in gleichem Maße hemmen, werden Diclofenac, Meloxicam und Nimesulid als präferenzielle COX-2-Inhibitoren bezeichnet (104), die eine stärkere Affinität zur COX-2 als zur COX-1 aufweisen, ohne jedoch selektiv für ein Enzym zu sein. Die neu entwickelten Coxibe gelten jedoch als COX-2-selektiv (Abb. 6). Dabei ist allerdings zu beachten, dass je nach Testsystem und untersuchender Arbeitsgruppe stark unterschiedliche Selektivitätswerte zu finden sind. Auch unterscheiden sich die Ergebnisse an rekombinanten humanen Enzymen stark von denen des Vollblutassays, was wahrscheinlich auf den Einfluss der Plasmaproteinbindung zurückzuführen ist (131). Die Selektivität wird anhand des Quotienten aus halbmaximaler Hemmkonzentration der COX-1 und der halbmaximalen Hemmkonzentration der COX-2, auch als Ratio bezeichnet, beschrieben.

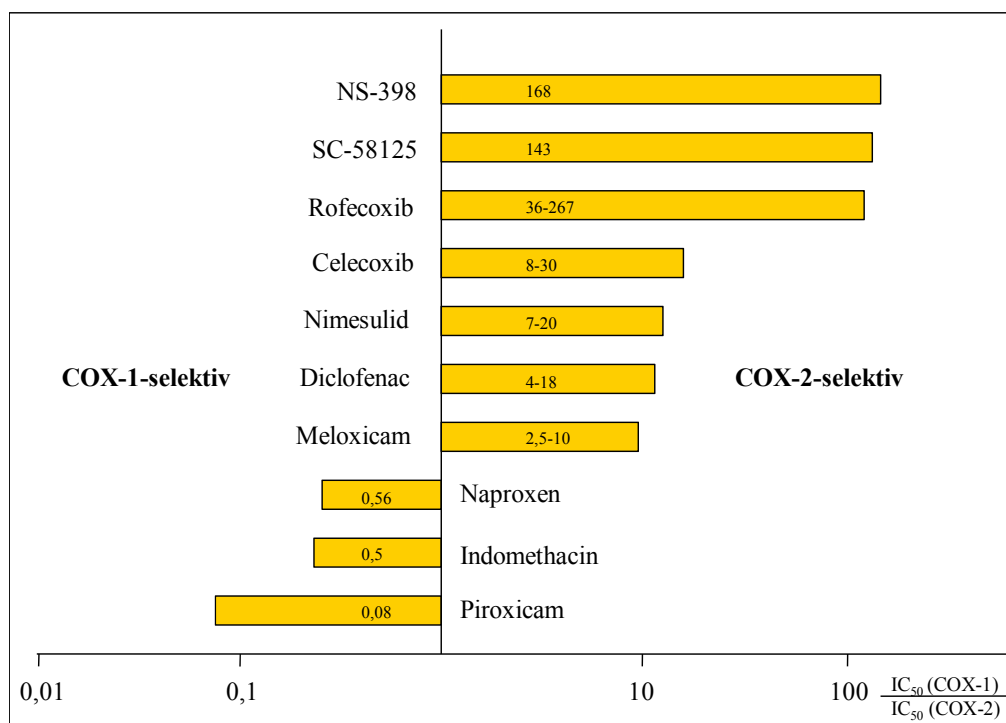


Abb. 6: Selektivität verschiedener Cyclooxygenase-Hemmstoffe im Vollblutassay nach der Methode von Patrigniani (104). Angegeben ist die Ratio der IC_{50} -Werte für die Hemmung der COX-1 bzw. COX-2.

Die nur für Testzwecke zu beziehende und häufig in Tierversuchen eingesetzte Substanz SC-58236 weist eine Ratio für die Hemmung von COX-1 zu COX-2 von 1780 auf und wäre somit ein sehr selektiver COX-2-Inhibitor (106). Dieser Wert wurde jedoch mittels rekombinanter humaner Enzyme erhoben, bei denen die Selektivität in der Regel mit bedeutend höheren Werten als im Vollblutassay angegeben wird. Andere Daten sind bisher nicht erhältlich.

Im Jahr 1999 wurde als erster COX-2-selektiver Inhibitor Rofecoxib zur Therapie der Osteoarthritis sowie bei rheumatoider Arthritis zugelassen, ein Jahr später folgte die Zulassung von Celecoxib. Rofecoxib und Celecoxib zeichneten sich in den Zulassungsstudien durch z. T. deutlich verminderte gastrointestinale Nebenwirkungen gegenüber dosisäquivalenten herkömmlichen NSAR aus. Später folgte die Zulassung von Etoricoxib (nicht in den USA), Valdecoxib und dem parenteral applizierbaren Parecoxib sowie des selektivsten COX-2-Inhibitors Lumiracoxib in Australien und der

EU im Januar 2007. Celecoxib erhielt in diesem Jahr zusätzlich eine Zulassung für die Therapie des Morbus Bechterew.

Die in sie gesetzten Erwartungen konnten die im Handel befindlichen Coxibe jedoch nicht vollständig erfüllen. Neben der gewünschten antiinflammatorischen Wirkung der Coxibe treten weiterhin z. T. schwerwiegende Nebenwirkungen wie Wasser- und Elektrolyteinlagerungen sowie eine erhöhte Herzinfarktrate gegenüber Placebo auf, was im Jahr 2004 zur Rücknahme von Rofecoxib vom deutschen Markt führte. Seitdem wird diskutiert, ob die kardiovaskulären Nebenwirkungen spezifisch für alle Substanzen dieser Arzneistoffklasse sind. Besonders wichtig ist hierbei eine Entscheidung der FDA aus dem Jahr 2005, die besagt, dass neben den selektiven COX-2-Inhibitoren auch alle NSAR wegen mangelnder Daten aus Langzeitstudien mit einem schwarzen Warnaufdruck versehen werden müssen, der auf das kardiovaskuläre Risiko sowie die potenziell tödlichen gastrointestinalen Nebenwirkungen verweist. Erhöhtes Risiko besteht v. a. bei der Einnahme von Indomethacin und Meloxicam (52, 132). Im Jahr 2005 empfahlen die amerikanische Zulassungsbehörde FDA sowie die europäische Zulassungsbehörde EMEA die Marktrücknahme von Valdecoxib wegen dermatologisch-allergischer unerwünschter Arzneimittelwirkungen. Aktuell entzog die australische Zulassungsbehörde TGA der neuesten Substanz dieser Arzneistoffklasse - Lumiracoxib - wegen z. T. schwerwiegender Leberschädigungen die Zulassung. In Deutschland erschien am 23. August 2007 ein Roter-Hand-Brief mit neuen Anwendungsbeschränkungen.

2 Problemstellung

Das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System ist ein wichtiges Regelsystem für den Blutdruck sowie den Salz- und Wasserhaushalt des Körpers. Die Signalwege, die zur Modulation der Renin-Genexpression und der Reninfreisetzung beitragen, sind aber nur teilweise bekannt. Als mögliche Botenstoffe werden seit langem Prostaglandine diskutiert, da zum einen PGE₂ und PGI₂ zu einer direkten Stimulation der Reninexpression und -freisetzung führen, zum anderen NSAR in der Lage sind, den Anstieg der Plasmareninaktivität als Antwort auf verschiedene Stimuli zu vermindern. Seit der Charakterisierung der konstitutiv in der Niere gebildeten COX-2 werden insbesondere Prostaglandine, die über dieses Enzym gebildet werden, näher untersucht. Die Enzyme Renin und COX-2 werden in der Rattenniere nicht nur in enger anatomischer Nähe exprimiert, sondern zudem auch parallel reguliert. Die bisher publizierten Untersuchungen zur Rolle der COX-2-gebildeten Prostaglandine in Ratten und Mäusen haben aber zum Teil kontroverse Ergebnisse hervorgebracht (siehe Abschnitt 1.5.4). Dabei wurden zum einen verschiedene COX-2-Inhibitoren in den Studien verwendet (Celecoxib, Rofecoxib, SC-58125, NS-398, SC-58236), zum anderen COX-2-Knock-out-Mäuse mit unterschiedlichem genetischen Hintergrund. Da eine hemmende Wirkung eines COX-2-Inhibitors auf das RAAS bisher nur bei Applikation von SC-58236 sowie SC-58125 über eine Woche festgestellt werden konnte, sollte der zeitliche Einfluss des COX-2-Inhibitors SC-58236 auf die basale Regulation der Reninexpression und -freisetzung *in vivo* untersucht werden. Anschließend ging es darum, im Tierversuch den Einfluss COX-2-gebildeter Prostaglandine auf die Modulation des RAAS durch bekannte Stimuli wie Nidrigsalzdiät, ACE-Hemmung oder AT₁-Rezeptorblockade, renovaskulärer Hypertension, Furosemid-Infusion, Isoprenalin-Infusion und Hydralazin-Gabe zu charakterisieren. Desweiteren sollte ein möglicher Effekt COX-1-gebildeter Prostaglandine auf das Renin-System untersucht werden.

3 Material

3.1 Chemikalien, Reagenzien und Pharmaka

3.1.1 Chemikalien und Reagenzien

Acetonitril zur Chromatografie	J.T.Baker, Groß-Gerau
Aqua ad injectabilia	Braun, Melsungen
Bovines Serum Albumin (BSA)	Sigma Aldrich, Steinheim
Bromphenolblau	Sigma Aldrich, Steinheim
Carrageenan	Sigma Aldrich, Steinheim
Chloroform p. A.	Merck, Darmstadt
Complete [®] Mini-Proteaseinhibitor	Roche Diagnostics, Mannheim
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Fluka, Buchs (Schweiz)
dNTP-Mix	Promega, Madison, WI (USA)
Ethanol	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid-Lösung (10 mg · mL ⁻¹)	Sigma Aldrich, Steinheim
Ethylendiamintetraessigsäure (Titriplex III: Na ₂ EDTA x 2 H ₂ O)	Merck, Darmstadt
Glycerin 87% (m · V ⁻¹)	Merck, Darmstadt
Glycin	Merck, Darmstadt
Gummi Arabicum Ph. Eur. 1997	Caesar & Lorenz, Hilden
Isopropylalkohol	Merck, Darmstadt
Isotone Kochsalzlösung	Braun, Melsungen
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt

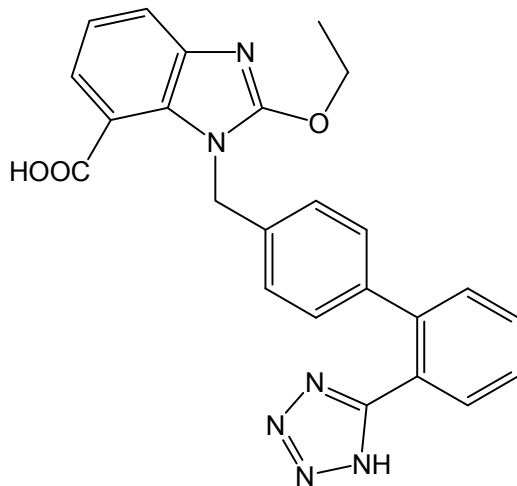
Lipopolysaccharid (LPS)	Sigma Aldrich, Steinheim
Magermilchpulver	Humana Milchunion, Herford
Magnesiumchlorid-Hexahydrat	Merck, Darmstadt
2-Mercaptoethanol	Merck, Darmstadt
Methanol p. A.	Merck, Darmstadt
M-MLV Reverse Transkriptase	Invitrogen, Karlsruhe
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Merck, Darmstadt
Natriumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Natriumhydroxid	Merck, Darmstadt
Phosphorsäure 85 %	Merck, Darmstadt
Ponceau S Solution	Sigma Aldrich, Steinheim
Recombinant RNasin [®] Ribonuclease Inhibitor	Promega, Madison, WI (USA)
RNase ZAP	Ambion, St. Austin, TX (USA)
Röntgen Rapid Entwickler	Adefo Chemie, Nürnberg
Salzsäure	Merck, Darmstadt
SeaKem [®] LE Agarose	BiozymScientific, Hess. Oldendorf
Sevorane [®] (Sevofluran)	Abott, Wiesbaden
Ssniff Alleinfutter für Ratten und Mäuse	ssniff Spezialdiäten, Soest
Tris (2-Amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propandiol)	USB Corporation Cleveland, OH (USA)
Trizol Reagent [®]	Invitrogen, Karlsruhe
Tween 20	Sigma Aldrich, Steinheim
Vario Fix Powder	Tetenal Photowerk, Norderstedt

3.1.2 Pharmaka

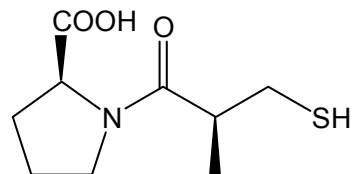
Candesartan	Astra Zeneca, Mölndal (Schweden)
Captopril	Sigma, Deisenhofen
Furosemid	Sigma, Deisenhofen
Hydralazin	Sigma, Deisenhofen
Isoprenalin	Sigma, Deisenhofen
Ramipril	Astra Zeneca, Mölndal (Schweden)
SC-560	Axxora, Lörrach
SC-58236	Axxora, Lörrach

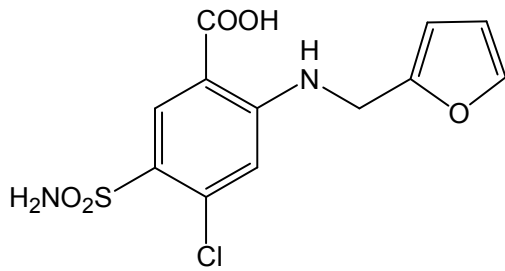
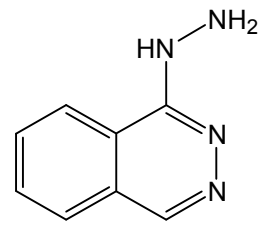
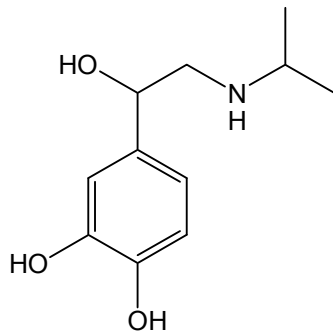
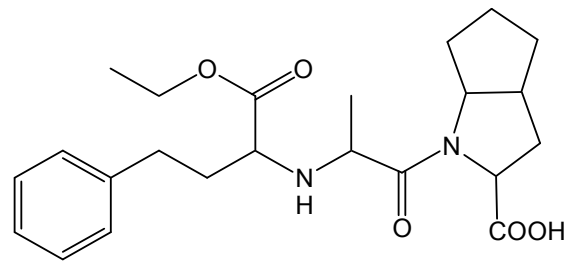
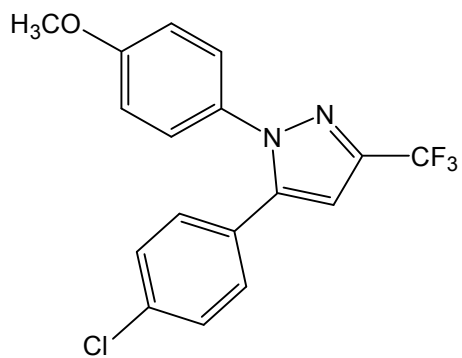
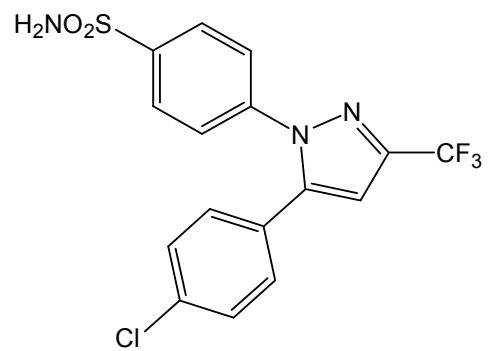
Strukturformeln der Pharmaka

Candesartan:



Captopril:



Furosemid:Hydralazin:Isoprenalin:Ramipril:SC-560:SC-58236:

3.2 Verbrauchsmaterialien

Blotting Papier		BioRad, München
Combitips, diverse Größen		Eppendorf, Hamburg
Hyperfilm ECL		Fluka, Buchs (Schweiz)
K ⁺ -EDTA-Monovetten		Sarstedt, Nümbrecht
Kanülen BD Microlance™		Becton Dickinson, Heidelberg
Kopierfolien		Radex, Rommerskirchen
Kunststoff-Küvetten		Sarstedt, Nümbrecht
Mikroküvetten		Eppendorf, Hamburg
LightCycler® Kapillaren		Roche Diagnostics, Mannheim
Mikrotestplatten		Sarstedt, Nümbrecht
Nitrocellulosemembran (Ø 0,45 µm)		BioRad, München
Osmotische Pumpen	Model 2ML1	Alzet Osmotic Pumps, Durect, Cupertino, CA (USA)
PCR-Gefäße (0,2 mL)		Sarstedt, Nümbrecht
Pipettenspitzen, diverse Größen		Sarstedt, Nümbrecht
Polypropylenröhrchen (4,5 mL)		Sarstedt, Nümbrecht
Polystyrolröhrchen (2 mL, 4,5 mL)		Sarstedt, Nümbrecht
readyGels (10 % / 12 %)		BioRad, München
Reagiergefäße (1,5 mL / 2 mL)		Eppendorf, Hamburg
Serologische Pipetten (5 mL / 10 mL / 25 mL)		Sarstedt, Nümbrecht
Silberclips	0,2-mm ID	Institut für Physiologie, Regensburg
Sterile Filterspitzen, diverse Größen		Gilson, Middleton, WI (USA)
Sterile Spritzen BD Discardit™		Becton Dickinson, Heidelberg
Zentrifugenröhrchen (15 mL / 50 mL)		Sarstedt, Nümbrecht

3.3 Geräte

Analysenwaage	BP 211D	Sartorius, Göttingen
Autoklav	KSG 112	KSG, Olching
ELISA-Reader	Sunrise	Tecan, Crailsheim
Gamma Counter	Compugamma CS 1282	LKB, Freiburg
Gefriertruhe	Privileg 031.342 8	Quelle, Fürth
Geldokumentation	BDA Digital	Biometra, Göttingen
Gelelektrophoreseapparatur	Mini Protean II System Wide Mini-Sub Cell GT	BioRad, München BioRad, München
Glaswaren	Bechergläser, Flaschen, Erlenmeyerkolben, Meßzylinder	Schott, Mainz
Handdispenser	Multipette pro	Eppendorf, Hamburg
Heizblock	Thermomixer compact	Eppendorf, Hamburg
Kühlschrank	FKS 3600	Liebherr, Ochsenhausen
Magnetrührer		Heidolph, Schwabach
Narkosegerät	Trajan 808	Drägerwerk AG, Lübeck
Operationsbesteck	Pinzetten, Scheren Skalpelle	Martin Medizin-Technik, Tuttlingen Roth, Karlsruhe
PCR-Gerät	T1-Thermocycler	Biometra, Göttingen
pH-Meter	MultiCal [®] pH 526	WTW, Weilheim
Photometer	BioPhotometer	Eppendorf, Hamburg
Pipetten, diverse Größen	Finnpipette Digital Gilson Microman	Thermo, Langenselbold Gilson, Middleton WI (USA)
Pipettierhilfe, motorbetrieben	Accu-Jet	Brand, Wertheim
Plattformschüttler	Innova 2000	New Brunswick, Nürtingen

Plethysmograph	BP-Recorder 8005	W + W Electronics, Basel (CH)
Power Supply	Power Pac 200	BioRad, München
Real-Time PCR System	LightCycler [®] 2.0	Roche Diagnostics, Mannheim
Schlundsonde	Animal Feeding Needle 75 x 1,5 mm	TSE, Kronberg/TS
Schüttelwasserbad	Typ CS 20	MGW Lauda
Sterilbank	Class II Type A/B3	Janke & Kunkel, Staufen
Tiefkühltruhe	ULT 1090-5VUB	Heraeus, Osterode
Ultra Turrax	TP 18-10	Janke & Kunkel, Staufen
Ultraschallgerät	Sonoplus UW 2070	Bandelin, Berlin
UV-Transilluminator	TI 1	Biometra, Göttingen
Vakuum-Station	Vac-Man [®]	Promega, Madison, WI (USA)
Vortexgerät	Reax 2000	Heidolph, Schwabach
Waage	PL 1200	Mettler-Toledo, Giessen
Wasseraufbereitungsanlage	Milli-Q Water	Millipore, Schwalbach
Zentrifugen	Megafuge 1.0R Centrifuge 541	Heraeus, Osterode Eppendorf, Hamburg

HPLC-Geräte:

Autosampler	SIL-10A	Shimadzu, Duisburg
Detektor	SPD 10AS	Shimadzu, Duisburg
Integrator	Integrator Class-LC10	Shimadzu, Duisburg
Pumpe	LC 10AT	Shimadzu, Duisburg
Säule	Synergi PolarRP 150 x 4,6 mm Nr. 162746-11	Waters, Eschborn
Säulenofen	ERC 125	ERC, Alteglofsheim
Steuergerät	SCL-10A	Shimadzu, Duisburg

3.4 Kommerzielle Kits

Bicinchonic Acid Protein Assay Kit	Sigma Aldrich, Steinheim
ECL™ Western Blotting Detection Reagents	Pierce, Holmdel, NJ (USA)
FastStart DNA Master SYBR Green I	Roche Diagnostics, Mannheim
Prostaglandin E ₂ EIA Kit – Monoclonal	Cayman Chemical, Ann Arbor, MI (USA)
RNeasy-Kit	Qiagen, Hilden
Renin RIA	Sorin Biomedica, Düsseldorf
Thromboxan B ₂ EIA Kit – Monoclonal	Cayman Chemical, Ann Arbor, MI (USA)

3.5 Antikörper und Standards

3.5.1 Antikörper

Murine COX-1	Cayman Chemicals
Murine COX-2	Cayman Chemicals
β -Aktin	Sigma, Deisenhofen
Chicken anti-rabbit IgG-HRP	Santa Cruz, Santa Cruz, CA (USA)
CruzMarker goat anti-rabbit	Santa Cruz, Santa Cruz, CA (USA)
Goat anti-mouse IgG-HRP	Santa Cruz, Santa Cruz, CA (USA)

3.5.2 Größen- und Molekulargewichtsstandards

CruzMarker MW Standards	Santa Cruz, Santa Cruz, CA (USA)
GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder	Fermentas, St. Leon-Rot
Precision Plus Protein™ Standards	BioRad, München

3.6 Oligonukleotide

3.6.1 Reverse Transkription

Oligo(dT) ₁₅ Primer (25 U)	Sigma Aldrich, Steinheim
---------------------------------------	--------------------------

3.6.2 Primer für die PCR

Alle verwendeten Oligonukleotide wurden von der Fa. MWG (Ebersberg) synthetisiert.

Gen		Sequenz (5' → 3')	Mg ²⁺ -Konz. (mmol · L ⁻¹)	Annealing- Temperatur	Länge
β-Aktin	sense	CGC CCT AGG CAC CAG GGT G	3	58 °C	283 bp
	antisense	GCT GGG GTG TTG AAG GTC TCA AA			
COX-1	sense	GCT GCT GAG AAG GGA GTT	3	58 °C	188 bp
	antisense	GGT GGT ACT GTC GTT CCA			
COX-2	sense	GAA ATG GCT GCA GAG TTG	3	58 °C	356 bp
	antisense	TCA TCT AGT CTG GAG TGG			
Renin	sense	AAG TCA TCT TTG ACA CGG	3	58 °C	191 bp
	antisense	TTA CCA CAT CTT GGC TGA			

Tab. 1: Oligonukleotidsequenzen für Gene der Ratte

3.7 Puffer und Zubereitungen der Pharmaka

3.7.1 Puffer für Arbeiten mit RNA und DNA

BSA-Stammlösung	10 mg BSA ad 5 mL gereinigtes Wasser
DEPC-Wasser	1 mL DEPC ad 1 L gereinigtes Wasser, schütteln und über Nacht stehen lassen, autoklavieren
10 x TBE Puffer	40 mL 0,5 mol · L ⁻¹ Na ₂ EDTA (pH = 8,0) 55 g Borsäure 108 g Tris ad 1000 mL gereinigtes Wasser
1 x TBE Puffer	10 x TBE 1:10 mit gereinigtem Wasser verdünnen
6 x Ladepuffer	9 mg Bromphenolblau 9 mg Xylen-Cyanol FF 1,2 mL 0,5 mol · L ⁻¹ Na ₂ EDTA pH = 8,0 6 mL 87 % Glycerol (m · V ⁻¹) ad 10 mL gereinigtes Wasser

3.7.2 Puffer für die Western Blot Analyse

SDS-Lysispuffer	0,3 g Tris 2,5 g SDS ad 250 mL gereinigtes Wasser, mit HCl auf pH = 7,4
-----------------	---

5 x SDS Probenpuffer	1,0 g SDS in 2,5 mL 1 mol · L ⁻¹ Tris/HCl (pH = 6,8), 0,5 mL β-Mercaptoethanol und 2 mL gereinigtem Wasser lösen, danach 5mg Bromphenolblau und 5 mL 87 % Glycerol (m · V ⁻¹) unterrühren
10 x Elektrophoresepuffer	10 g SDS 30 g Tris 144 g Glycin ad 1000 mL gereinigtes Wasser, mit HCl auf pH = 7,5
1 x Elektrophoresepuffer	10 x Elektrophoresepuffer 1:10 mit gereinigtem Wasser verdünnen
1 x Transferpuffer	3 g Tris 14 g Glycin 200 mL Methanol ad 1000 mL gereinigtes Wasser
Blockierlösung	TBS-T mit 5 % (m · V ⁻¹) Magermilchpulver
10 x TBS	5,1 g MgCl ₂ · 6 H ₂ O 58.4 g NaCl 121,1 g Tris ad 1000 mL gereinigtes Wasser, mit HCl auf pH = 7,4

1 x TBS-T	10 x TBS 1:10 mit gereinigtem Wasser verdünnen, dazu 0,1 % ($V \cdot V^{-1}$) Tween 20
-----------	---

3.7.3 Zubereitungen der Pharmaka zur Applikation *in vivo*

Candesartan	15 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ in einer 5 % igen Gummi Arabicum Suspension ($\text{m} \cdot \text{V}^{-1}$)
Captopril	100 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ in Trinkwasser gelöst
Furosemid	12 $\text{mg} \cdot \text{d}^{-1}$ über osmotische Pumpe
Hydralazin	30 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ in Trinkwasser gelöst 30 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ in isotonischer Kochsalzlösung (i. p.)
Isoprenalin	160 $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ über osmotische Pumpe
Ramipril	10 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ im Trinkwasser gelöst
SC-560	10 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ in einer 5 % igen Gummi Arabicum Suspension ($\text{m} \cdot \text{V}^{-1}$)
SC-58236	10 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ in einer 5 % igen Gummi Arabicum Suspension ($\text{m} \cdot \text{V}^{-1}$)
Carrageenan	1 % ($\text{m} \cdot \text{V}^{-1}$) in steriler Kochsalzlösung

3.8 Versuchstiere

Für die experimentiellen Tierversuche wurden ausschließlich männliche Sprague Dawley (SD) Ratten (Fa. Charles River, Sulzfeld) verwendet. Alle Tiere waren zu Versuchsbeginn etwa 180 – 200 g schwer.

4 Methoden

4.1 Tierversuche

Alle Tierversuche wurden gemäß Antrag durch die Tierschutzkommission der Regierung der Oberpfalz genehmigt (Aktenzeichen 54-2531.1-23/05) und nach den geltenden Bestimmungen des Tierschutzgesetzes durchgeführt.

4.1.1 Tierhaltung

Die Haltung der Ratten erfolgte in Gruppen von bis zu 5 Tieren pro Käfig. Vor Beginn der Versuche wurden die Tiere über einen Zeitraum von 5 Tagen an die lokalen Bedingungen am Versuchsort adaptiert. Dabei erhielten alle Tiere freien Zugang zu Standardfutter und Trinkwasser. Das Streumaterial wurde zweimal wöchentlich erneuert. Im Tierstall wurden folgende für Nager optimale Haltungsbedingungen hergestellt:

- Temperatur: $23\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$
- Relative Luftfeuchtigkeit: $55\% \pm 5\%$
- Hell-Dunkel-Intervall: 12 h

Die Tötung aller Ratten erfolgte durch Dekapitation unter Inhalationsnarkose mit Sevofluran.

4.1.2 Verabreichung der Pharmaka

Alle Tiere wurden nummeriert, danach gewogen und das Gewicht protokolliert. Es wurde darauf geachtet, dass alle Tiere ein Gewicht von 180 – 200 g aufwiesen.

Zu Versuchsbeginn wurde das Standardfutter je nach Versuchsgruppe erneuert, durch eine Niedrigsalz- oder eine Hochsalzdiät ersetzt. Die Tiere erhielten weiterhin Trinkwasser *ad libitum*. Tiere, die mit Furosemid behandelt wurden sowie deren Kontrollgruppen erhielten zusätzlich zum normalen Trinkwasser eine zweite Trinkflasche einer 0,9 % igen Natriumchlorid- ($m \cdot V^{-1}$) und einer 0,1 % igen Kaliumchlorid-Lösung ($m \cdot V^{-1}$). Der Verbrauch an Trinkwasser und Salzlösung wurde täglich protokolliert.

Die Applikation der Pharmaka über den in den einzelnen Versuchen angegebenen Zeitraum erfolgte auf vier verschiedenen Wegen:

- Über das Trinkwasser
- Über eine Schlundsonde
- Intraperitoneal (i. p.)
- Mittels osmotischer Pumpen

Für die Verabreichung der Pharmaka über das Trinkwasser wurde zuvor in der Adaptationszeit bestimmt, wieviel Trinkwasser eine Tiergruppe pro Käfig pro Tag aufnahm. Dabei wurde die Annahme zugrunde gelegt, dass jedes Tier im Käfig in etwa gleiche Mengen an Wasser zu sich nimmt. Die Konzentration des Pharmakons im Trinkwasser wurde so eingestellt, dass die nötige Pharmakonmenge über den Tag hinweg aufgenommen wurde. Die tägliche Trinkwassermenge wurde protokolliert, um Veränderungen im Trinkverhalten feststellen zu können.

Bei der oralen Applikation mittels Schlundsonde erhielten die Tiere ca. 1 mL der Flüssigkeit, in der das Pharmakon suspendiert wurde. An diesen Vorgang wurden die Tiere zuvor gewöhnt. Die Kontrollgruppen wurden auf gleiche Weise mit Vehikel behandelt.

Für die i. p.-Applikation wurde der Arzneistoff unter sterilen Bedingungen gelöst. Die Ratten wurden vor der Verabreichung eines Volumens von 0,5 mL durch Inhalationsnarkose mit Sevofluran betäubt. Die Kontrolltiere erhielten auf gleiche Weise physiologische Kochsalzlösung.

Die osmotischen Pumpen wurden unter andauernder Inhalationsnarkose unter die Oberhaut gesetzt. Die Wunde wurde durch Klammerung und Behandlung mit flüssigem Wundpflaster verschlossen.

Die Stenose der linken Nierenarterie wurde durch die Verengung dieses Gefäßes mittels eines Klips mit einem Durchmesser von 0,2 mm herbeigeführt. Dazu wurden die Tiere unter Inhalationsnarkose mit Sevofluran operiert und der Klip über die Arterie geschoben. Bei den Kontrolltieren wurde die Nierenarterie nur mit einer Pinzette berührt. Die Operationswunde wurde durch Klammerung und Behandlung mit flüssigem Wundpflaster verschlossen.

Die Tiere wurden während der Behandlung regelmäßig gewogen und die ermittelten Gewichte protokolliert.

4.1.3 Plethysmographische Blutdruckmessung

Der systolische Druckverlauf sowie die Herzfrequenz der Tiere unter den Versuchsbedingungen wurden anhand der plethysmographischen Blutdruckmessung beobachtet. Zur Erweiterung der Rattenschwanzarterien wurden die Tiere in einer durch Umluft auf 36 °C temperierten Plastikbox in kleinen Käfigen immobilisiert. Die Messung erfolgte nach ca. 10 min am aufgewärmten Rattenschwanz. Dazu wurden die arteriellen Schwankungen nach Anlegen der Druckmanschette und des Druckaufnehmers (Piezokristallring) auf einen Thermoschreiber mit skaliertem Papier übertragen und aufgezeichnet (66). Der Maximaldruck in den vier Schwanzarterien

entspricht dem systolischen Blutdruck. Die arteriellen Pulswellen sind nicht mehr messbar, wenn der Druck in der Manschette den systolischen Blutdruck übersteigt. Vor Versuchsbeginn wurden die Tiere an die Messungen gewöhnt.

4.1.4 Messung des mittleren arteriellen Drucks

Für die Messung des mittleren arteriellen Drucks (MAD) wurde die Arteria carotis der Tiere unter Sevofluran-Narkose bei kontrollierter Ventilation kanüliert. Nach i. p.-Applikation der Versuchssubstanz wurde die Blutdruckentwicklung innerhalb der ersten 30 min vermessen.

4.1.5 Gewinnung von Plasma und Organentnahme

Die Tötung der Ratten erfolgte nach der jeweils angegebenen Versuchszeit durch Dekapitation unter Inhalationsnarkose mit Sevofluran.

Das restliche Vollblut wurde in K⁺-EDTA-Monovetten aufgefangen, geschüttelt und anschließend 10 min bei 4000 U · min⁻¹ zentrifugiert. Das sich im Überstand befindliche Plasma wurde in je zwei Polystyrolröhrchen aliquotiert und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

Die Nieren wurden entnommen, von der Nierenkapsel befreit und der Länge nach geschnitten. Unter dem Mikroskop erfolgte die Trennung in Nierencortex, äußere Medulla (OM) und innere Medulla (IM) mittels Skalpell. Die einzelnen Teile wurden sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Bis zur weiteren Untersuchung wurde das Material bei -70 °C gelagert.

4.1.6 Bestimmung der COX-2-Selektivität von SC-58236

Die Bestimmung der Selektivität des COX-2-Inhibitors SC-58236 erfolgte nach einem modifizierten air pouch-Modell (100). Hierzu wurden den Tieren für 7 Tage Vehikel oder SC-58236 verabreicht. Über eine Woche hinweg wurde den Tieren in die Unterhaut am Rücken Luft injiziert, um ein Luftpolster zu bilden. Zwei Stunden vor Versuchsende wurden den Ratten in dieses Luftpolster hinein 2 mL einer sterilen

Carrageenan-Lösung injiziert. Zum Versuchsende wurden die Tiere mittels Sevofluran-Inhalationsnarkose betäubt, das Polster geöffnet und das entstandene Exsudat abpipettiert. Dieses wurde später auf PGE₂-Bildung untersucht. Nach der Dekapitation wurde das Vollblut in einem 1,5 mL Reaktionsgefäß gesammelt und für eine Stunde unter Schütteln bei 37 °C inkubiert. Nach anschließender Zentrifugation wurde das Serum in ein neues Reaktionsgefäß überführt und daraus die Menge des gebildeten TxB₂ als stabiler Metabolit von TxA₂ bestimmt. Desweiteren wurde ein Teil des Magens entnommen, gesäubert und in flüssigem Stickstoff gelagert, um daraus PGE₂ zu bestimmen.

4.2 Bestimmung der Konzentration von SC-58236 im Rattenplasma

Die Plasmakonzentration von SC-58236 wurde mittels HPLC nach der Methode von McAdam *et al.* bestimmt (94). Dazu wurde je ein Aliquot der Plasmaproben erneut 5 min bei 10.000 U · min⁻¹ zentrifugiert, um eventuell noch vorhandene zähflüssige oder feste Bestandteile zu entfernen. 100 µL Plasma wurden zur Enteiweißung mit 200 µL Acetonitril versetzt, der Reaktionsansatz gemischt und 15 min im Kühlschrank inkubiert. Nach 10-minütiger Zentrifugation bei 10.000 U · min⁻¹ wurden je 150 µL Überstand in ein Minivial überführt. Ein Aliquot von 10 µL wurde in die HPLC-Anlage injiziert.

Als stationäre Phase wurde eine Synergi PolarRP Fertigsäule (150 x 4,6 mm) verwendet. Der Eluent wurde aus 200 mL Phosphatpuffer pH = 3,0 und 300 mL Acetonitril vor jeder Analysenreihe hergestellt, die Anlage anschließend equilibriert.

Es wurden folgende Parameter am HPLC-System eingestellt bzw. detektiert:

- Fluss: 1,0 mL · min⁻¹
- Druck: 72 bar
- Säulentemperatur: 30 °C
- Detektor: 251 nm
- Retentionszeit: 5,5 min

Zur Kalibrierung wurden Plasmaproben aus unbehandelten Ratten, die mit einer definierten Menge SC-58236 versetzt waren, jeweils am Anfang und am Ende der Analysenreihe vermessen. Die quantitative Auswertung der Chromatogramme erfolgte über die Peakhöhe.

4.3 Proteinbiochemische Methoden

4.3.1 Proteinaufbereitung aus den Geweben

Um eine Degradation der Proteine zu vermeiden, wurden die Isolierung der Gesamtproteine aus den Geweben sowie alle nachfolgenden Schritte auf Eis durchgeführt. Desweiteren wurden dem Lysispuffer Protease-Inhibitoren (Fa. Roche) hinzugefügt.

Jeweils 30 – 80 mg tiefgefrorenes Gewebe wurde abgewogen und mit der 10-fachen Menge eiskaltem SDS-Lysispuffer versetzt. Die Homogenisation erfolgte mittels Ultraschallstab 3 x 5 s. Anschließend wurde die Lösung 10 min bei 8.000 U · min⁻¹ abzentrifugiert, der klare Überstand aliquotiert und bei -70 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

4.3.2 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Proteinkonzentration wurde colorimetrisch in jeweils einem Aliquot mit dem Bicinchonic Acid (BCA) Protein Assay Kit der Fa. Sigma bestimmt. Die Proteinextrakte wurden dazu im Verhältnis 1:26 mit SDS-Lysispuffer verdünnt. Aus einer BSA-Stammlösung wurde mit demselben Lysispuffer eine Standardreihe von 200 - 1000 µg Protein pro Milliliter Lösung frisch hergestellt. Je 25 µL Lysispuffer als Leerwert, Standard bzw. Probe wurden in einer Mikrottestplatte mit 200 µL einer BCA-Kupfersulfat-Mischung versetzt und unter Schütteln für 30 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend konnte der violette Farbkomplex mit einem Absorptionsmaximum bei 562 nm im ELISA-Reader vermessen und die Konzentration im Verhältnis zur mitgeführten Standardreihe ermittelt werden.

4.3.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Proteine können als SDS-Proteinkomplexe nach ihrem Molekulargewicht elektrophoretisch getrennt werden. Die Auftrennung erfolgte über eine vertikale, diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach der Methode von Laemmli (84). Dazu wurden Tris-HCl-Fertiggele mit einem Massenanteil von 10 % Polyacrylamid sowie das Mini-Protean II System der Fa. BioRad verwendet.

In Abhängigkeit von dem zu untersuchenden Protein und dessen Auftreten in den einzelnen Geweben wurden 1 – 100 µg Gesamtprotein mit SDS-Probenpuffer im Verhältnis 5:1 versetzt. Die Denaturierung dieser Proben vor dem Auftragen auf das Gel erfolgte durch 5-minütige Inkubation bei 95 °C. Für die spätere Identifizierung der Proteine wurde zusätzlich ein vorhandener Molekulargewichtsmarker aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte bei einer konstanten Spannung von 130 V für 90 Minuten.

4.3.4 Western Blot

Für die später folgende Immunfärbung wurden die im SDS-Gel aufgetrennten Proteine elektrophoretisch auf eine Nitrocellulosemembran transferiert. Dazu wurde das Gel auf eine Anodenplatte mit Glasfasermatte und 3 Lagen Transferpuffer-getränkten Blotting-Papieren überführt, eine ebenso angefeuchtete Nitrocellulosemembran luftblasenfrei

aufgelegt und mit feuchtem Filterpapier, Glasfasermatte und Kathodenplatte überschichtet. Das Blotting erfolgte bei einer konstanten Stromstärke von 200 mA für eine Stunde in der Blot-Apparatur der Fa. BioRad.

Für eine Kontrolle des Transfers der Proteine aus dem Gel auf die Nitrocellulosemembran wurde die Membran 30 s mit einer Ponceaurot-Lösung inkubiert, anschließend die überschüssige Farbe abgewaschen. Dieser Vorgang fixiert die Proteine zusätzlich an der Membran. Eine nachfolgende Immunfärbung ist möglich.

4.3.5 Detektion der membrangebundenen Proteine durch Immunfärbung

Die nicht besetzten Proteinbindungsstellen auf der Nitrocellulosemembran wurden vor der Immunfärbung durch einstündige Inkubation mit Blockierlösung abgesättigt.

Anschließend wurde die Membran bei 4 °C über Nacht oder eine Stunde bei Raumtemperatur mit einer Zubereitung des primären Antikörpers in Blockierlösung inkubiert. Um möglichst nur spezifische Banden zu detektieren, wurde die optimale Verdünnung des Antikörpers vorab ermittelt; diese ist in Tab. 2 ersichtlich. Nach der Inkubation wurde die Membran 3 x 10 min mit TBS-T-Puffer gewaschen, um überschüssigen primären Antikörper zu entfernen. Es folgte die Inkubation mit dem passenden sekundären, Meerrettichperoxidase (HRP)-gekoppelten Antikörper für eine Stunde bei Raumtemperatur oder bei 4 °C über Nacht. Die optimale Verdünnung des Antikörpers wurde dabei ebenso vorab ermittelt und ist in Tab. 2 ersichtlich. Anschließend wurde die Membran 3 x 10 min mit TBS-T-Puffer gewaschen, um überschüssigen sekundären Antikörper zu entfernen.

Antikörper	Verdünnung
COX-2	1:1000
COX-1	1:1000
Aktin	1:5000
chicken anti rabbit	1:1000
goat anti mouse	1:5000

Tab. 2: Optimale Verdünnung verschiedener Antikörper beim Western Blot

Die Detektion erfolgte mit dem Enhanced Chemiluminescence Kit (ECL-Kit) der Fa. Pierce, welches zum einen eine Lösung von Luminol, p-Cumarsäure in 1 M Tris-Puffer pH = 8,5, zum anderen eine Wasserstoffperoxidlösung enthält. Der Nachweis beruht auf der durch die Peroxidase katalysierten Oxidation von Luminol, wodurch eine Chemilumineszenz ausgelöst wird; die entstehende Lichtemission wird über einen Röntgenfilm gemessen. Die Nitrocellulosemembran wird mit einem Gemisch beider ECL-Lösungen für 1 min inkubiert, die Membran anschließend zwischen zwei Kopierfolien ausgestrichen, um überschüssiges Reagenz zu entfernen, und der Röntgenfilm 5 - 15 min belichtet. Durch anschließendes Entwickeln und Fixieren des Films werden die Banden dauerhaft sichtbar gemacht.

4.3.6 Nachweis löslicher Proteine mit dem Enzym-Immunoassay

Die Quantifizierung löslicher Proteine wurde mit den entsprechenden ELISA-Kits der Fa. Cayman nach den Vorschriften des Herstellers durchgeführt. In Analogie zu Kapitel 4.3.1 wurden Proteinextrakte aus den Geweben hergestellt, wobei diesmal der im Kit vorhandene EIA-Puffer statt SDS-Lysispuffer verwendet wurde, um mögliche Inkompatibilitäten mit Bestandteilen der Kits zu vermeiden.

Der Nachweis beruht auf der Adsorption des zu untersuchenden Proteins in Konkurrenz zu einer konstanten Menge zugesetzten Acetylcholinesterase-gekoppelten (AChE) Konjugates an eine definierte Menge spezifischen monoklonalen Antikörper innerhalb

von 16 h. Die Menge des gebundenen AChE-Konjugates verhält sich dabei umgekehrt proportional zur Menge des zu untersuchenden Proteins. Für die Detektion wird dabei die durch AChE geförderte Hydrolyse von Acetylthiocholin zu Thiocholin genutzt. Dieses Thiocholin reagiert in einer nichtenzymatischen Reaktion mit 5,5'-Dithio-*bis*-(2-nitrobenzoesäure) wobei u. a. 5-Thio-2-nitrobenzoesäure entsteht, welche bei 412 nm mit einem Elisa-Reader vermessen werden kann.

Für die Quantifizierung wurde eine definierte Standardreihe mitgeführt. Die Proben wurden in mehreren Verdünnungen vermessen, um Absorptionen innerhalb der Reichweite der Standardkurve zu erhalten. Bei der Quantifizierung wurde die unspezifische Bindung berücksichtigt. Die Bindung des AChE-Konjugates wurde in Bezug zur maximalen Bindung gesetzt und daraus im Verhältnis zur Standardkurve die Konzentration an Untersuchungsprotein bestimmt.

4.4 Gentechnische Methoden

4.4.1 Vorkehrungen bei Arbeiten mit RNA

Da die ubiquitär vorkommenden RNasen im Vergleich zu DNasen sehr stabil sind und keine Cofaktoren wie Mg^{2+} benötigen, um aktiv zu sein, müssen für die Erhaltung der Identität der RNA besondere Vorkehrungen getroffen werden.

Um eine Kontamination mit RNase zu vermeiden, wurden bei allen Arbeiten stets Handschuhe getragen und alle Arbeitsflächen und Geräte mit RNase-ZAP gründlich gereinigt. Es wurden ausschließlich sterile und RNase-freie Glas- und Plastikware sowie mit DEPC vorbehandeltes gereinigtes Wasser verwendet; alle Reagenzien waren ausschließlich für den Gebrauch mit RNA bestimmt. Sämtliche Arbeiten wurden, sofern nicht anders angegeben, auf Eis durchgeführt.

4.4.2 Isolierung der Gesamt-RNA mit Trizol-Reagent®

Bei Trizol-Reagent® handelt es sich um eine Flüssigkeit, bestehend aus Phenol und Guanidiniumthiocyanat, mit der nach der modifizierten Methode von Chomczynski und Sacchi die Gesamt-RNA aus Geweben isoliert werden kann (27).

Jeweils 100 – 300 mg gefrorenes Gewebe wurde in 1 – 3 mL Trizol-Reagent® mit dem Ultraturrax homogenisiert und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden pro mL Trizol-Reagent® 200 µL Chloroform zupipettiert, die Proben 15 s im Ständer heftig geschüttelt und für weitere 3 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Phasentrennung erfolgte durch 15-minütige Zentrifugation bei $6000 \text{ U} \cdot \text{min}^{-1}$ und $4 \text{ }^\circ\text{C}$. Die obere wässrige Phase wurde in ein neues Polypropylenröhrchen überführt und mit 500 µL Isopropylalkohol pro mL Trizol-Reagent® während einer 10-minütigen Inkubation gefällt. Der Niederschlag wurde 10 min bei $6000 \text{ U} \cdot \text{min}^{-1}$ und $4 \text{ }^\circ\text{C}$ abzentrifugiert und der Überstand anschließend verworfen. Das Pellet wurde mit 1 mL Ethanol 70 % ($\text{V} \cdot \text{V}^{-1}$) pro mL Trizol-Reagent® gewaschen und nochmals 5 min bei $4000 \text{ U} \cdot \text{min}^{-1}$ und $4 \text{ }^\circ\text{C}$ zentrifugiert. Das entstandene Pellet wurde vom Überstand befreit und 5 - 10 min an der Luft getrocknet. Je nach Größe des Pellets wurde dieses in 100 - 1000 µL DEPC-Wasser gelöst und die so entstandene RNA-Lösung in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Nach der Konzentrationsbestimmung konnte die RNA bei $-70 \text{ }^\circ\text{C}$ dauerhaft gelagert werden.

4.4.3 Isolierung der Gesamt-RNA mit dem RNeasy-Kit

Bei Gewebstücken mit einem Gewicht kleiner als 100 mg wurde die RNA-Isolierung mittels RNeasy-Säulen von Qiagen durchgeführt. Dazu wurde das gesamte Gewebe in je 700 µL Lysispuffer, bestehend aus dem im Kit befindlichen RLT-Puffer und 2-Mercaptoethanol, mittels Ultraschallstab $2 \times 10 \text{ s}$ homogenisiert. Die restlichen festen Bestandteile wurden für 5 min bei $10.000 \text{ U} \cdot \text{min}^{-1}$ und $4 \text{ }^\circ\text{C}$ abzentrifugiert und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Das Lysat wurde mit einem Volumenteil 70 % Ethanol ($\text{V} \cdot \text{V}^{-1}$) gemischt. Dieses Gemisch wurde in zwei Teilmengen à 700 µL in eine RNeasy-Säule pipettiert, 1 min bei $10.000 \text{ U} \cdot \text{min}^{-1}$ abzentrifugiert und der Durchlauf verworfen. Die Säulchen wurden mit 700 µL RW1-

Puffer gewaschen und die Flüssigkeit wiederum abzentrifugiert. Im nächsten Schritt wurde die am Säulchen gebundene RNA zweimal mit RPE-Puffer von fremden Bestandteilen befreit und alle Reste an Lösung durch zweimalige Zentrifugation bei $12.000 \text{ U} \cdot \text{min}^{-1}$ beseitigt. Die RNA wurde in ein neues Gefäß eluiert, wobei die Säulchen zweimal mit je $30 \mu\text{L}$ RNase-freiem Wasser für 3 min inkubiert wurden und das Eluat durch Zentrifugation bei $12.000 \text{ U} \cdot \text{min}^{-1}$ erhalten wurde. Nach der Konzentrationsbestimmung konnte die RNA bei $-70 \text{ }^\circ\text{C}$ dauerhaft gelagert werden.

4.4.4 Bestimmung der RNA-Konzentration

Die Ausbeute an Gesamt-RNA wurde durch Messung der optischen Dichte (OD) bei 260 nm photometrisch bestimmt, wobei eine OD von 1 einer Konzentration von $40 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ RNA in der Lösung entspricht. Zur Konzentrationsbestimmung wurden die Proben jeweils 1:40 in DEPC-Wasser verdünnt.

Die Reinheit der RNA kann anhand der Ratio der OD bei 260 nm und 280 nm ermittelt werden. Es wurde ausschließlich RNA mit einer $\text{Ratio}_{260/280}$ von 1,5 - 2,0 verwendet.

4.4.5 Reverse Transkription

Für die Synthese einzelsträngiger cDNA wurde eine Reverse Transkription unter Verwendung der M-MLV Reversen Transkriptase durchgeführt. Dazu wurden je $2 \mu\text{g}$ Gesamt-RNA mit $0,025 \text{ U}$ Oligo(dT) Primer versetzt und der Ansatz zu $10 \mu\text{L}$ mit DEPC Wasser ergänzt. Diese Mischung wurde für 5 min bei $65 \text{ }^\circ\text{C}$ im Thermocycler erhitzt und anschließend sofort auf Eis gestellt. Diesem Ansatz wurde nun eine Mischung aus $0,5 \mu\text{L}$ RNasin, $1 \mu\text{L}$ M-MLV-RT, $2,5 \mu\text{L}$ DEPC-Wasser, $4 \mu\text{L}$ dNTP (10 mM) und $4 \mu\text{L}$ Reaktionspuffer hinzugefügt. Die cDNA-Synthese erfolgte bei $37 \text{ }^\circ\text{C}$ für eine Stunde, gefolgt von einer zweiminütigen Inaktivierung bei $95 \text{ }^\circ\text{C}$ im Thermocycler. Die cDNA konnte nun bei $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ dauerhaft gelagert werden.

4.4.6 Quantitative PCR mit dem LightCycler®-System

Zur relativen quantitativen Bestimmung nutzt man die Kinetik der PCR aus, indem man in dem Bereich, in dem die Amplifikation exponentiell verläuft, C_T -Werte bestimmt und diese relativ zu einer mitgeführten Standardreihe zur Konzentrationsbestimmung des PCR-Produktes heranzieht. Um Schwankungen in der Effizienz der cDNA-Synthese auszugleichen, wird die Berechnung gegen einen externen Standard, ein Haushaltsgen, durchgeführt, von dem anzunehmen ist, dass es innerhalb eines Gewebes unter den Versuchsbedingungen in konstanter Menge exprimiert wird.

Die quantitative Real-time PCR wurde mit dem FastStart DNA Master SYBR Green I Kit und dem LightCycler® 2.0 der Fa. Roche Diagnostics durchgeführt. In spezielle LightCycler® Kapillaren wurde ein Ansatz aus 2 μ L cDNA der zu analysierenden Probe aus der Reversen Transkription, 2 μ L des Master Mixes, je 1 μ L sense und antisense Primer sowie die für die Primer optimale $MgCl_2$ -Konzentration pipettiert. Das Amplifikationsprotokoll bestand aus einem initialen Denaturierungsschritt von 10 min bei 95 °C gefolgt von 40 Zyklen, jeweils bestehend aus 10 s bei 95 °C zur Denaturierung, 7 s bei optimaler Annealingtemperatur (siehe Tab. 1) und 18 s bei 72 °C für die Elongation. Die Fluoreszenzmessung für die Quantifizierung erfolgte nach jedem Zyklus am Ende der Elongationsphase. Zur weiteren Spezifizierung des PCR-Produktes wurde eine Schmelzkurvenanalyse angeschlossen, wobei die DNA mit einer Rate von $0,1 \text{ } ^\circ\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$ von 58 °C auf 95 °C erhitzt und kontinuierlich die Fluoreszenz gemessen wurde. Neben den zu untersuchenden Proben wurde eine Negativkontrolle mitgeführt. Die Quantifizierung erfolgte relativ zu einer Standardreihe aus einer stimulierten Probe des Versuchs. Zusätzlich wurden von jeder PCR drei Proben aufgehoben und deren Produkte mittels Agarosegelelektrophorese weiter charakterisiert.

4.4.7 Agarosegelelektrophorese

Es wurden Agarosegele mit einer Agarosekonzentration von 2 % ($\text{m} \cdot \text{V}^{-1}$) hergestellt; dafür wurden 2 g Agarose in 100 mL TBE-Puffer aufgeköcht, mit 2 μ L Ethidiumbromid-Lösung versetzt und in eine Gelkammer gegossen. Die gesammelten DNA-Proben wurden im Verhältnis 6:1 mit Ladepuffer gemischt, in die Geltaschen pipettiert

und bei einer konstanten Spannung von 100 V elektrophoretisch getrennt. Zur Identifizierung der Fragmentlänge wurde ein geeigneter Längenstandard (Fa. Fermentas) mitgeführt. Durch Interkalation des im Gel enthaltenen Ethidiumbromids in die zu untersuchende DNA konnte diese bei einer Anregungswellenlänge von 254 nm sichtbar gemacht und dokumentiert werden. Die Länge der DNA-Fragmente wurde mit der zu erwartenden Fragmentlänge verglichen und auf Reinheit untersucht.

4.5 Bestimmung der Plasmapreninaktivität

Um die Aktivität von Renin im Plasma zu bestimmen, wurde in einer enzymatisch katalysierten Reaktion die Renin-abhängige Bildung von Angiotensin-I (Ang-I) aus Angiotensinogen bestimmt. Die Bestimmung der Ang-I-Konzentration erfolgte mit einem Radioimmunoassay (RIA) der Fa. Sorin. Alle Schritte wurden, sofern nicht anders angegeben, auf Eis durchgeführt.

Ein Aliquot Plasma wurde nach dem Auftauen 10 min bei 4 °C und $10.000 \text{ U} \cdot \text{min}^{-1}$ zentrifugiert, um eventuell noch vorhandene zähflüssige oder feste Bestandteile zu entfernen. 500 μL dieses Plasmas wurden in einem Reaktionsgefäß mit 10 μL PMSF - einem Enzyminhibitor zur Hemmung des Konversions-Enzyms - sowie 50 μL Reaktionspuffer versetzt. Nach Aufteilung dieses Reaktionsgemisches in zwei 200 μL -Ansätze erfolgte die Inkubation des ersten Ansatzes im Eisbad (Probenleerwert) und des zweiten für 90 min bei 37 °C zur Ang-I-Bildung. Nach der Inkubation wurde dieser Ansatz sofort auf Eis gestellt. Je 50 μL Probe oder Kalibrator wurden nun in ein mit Antikörper gegen Ang-I beschichtetes Röhrchen pipettiert und mit je 500 μL ^{125}I -markiertem Ang-I in einer definierten Konzentration versetzt. Nach einer 3 bis 24-stündigen Inkubation bei Raumtemperatur wurde der wässrige Überstand sorgfältig entfernt und die im Röhrchen verbliebene Radioaktivität mittels γ -Zähler bestimmt. Um die entstandenen Ang-I-Konzentrationen zu ermitteln, wurde die Konzentration der im Eisbad inkubierten Probe von der bei 37 °C inkubierten Probe subtrahiert. Die PRA wurde als $\text{ng freigesetztes Ang-I} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{mL}^{-1}$ berechnet.

4.6 Statistik

Alle Messdaten sind als arithmetische Mittelwerte \pm Standardfehler des Mittelwertes (MW \pm SEM) ausgedrückt.

Die Auswertung der Ergebnisse erfolgte für den Vergleich zweier Gruppen anhand des zweiseitigen Student's t-Test, für mehrere Gruppen mittels ANOVA (einfaktorielle Varianzanalyse).

5 Ergebnisse

COX-2-gebildete Prostaglandine werden als wichtige Botenstoffe für die Regulation des Renin-Systems als Antwort auf verschiedene Stimuli angesehen. Viele widersprüchliche Ergebnisse zur Rolle COX-2-gebildeter Prostaglandine für die Stimulation des Renin-Systems sind auf die Verwendung unterschiedlicher COX-2-Inhibitoren sowie differierender Studienprotokolle zurückzuführen. Deswegen wurde in der hier vorliegenden Arbeit für die *in vivo*-Untersuchungen der selektive COX-2-Inhibitor SC-58236 verwendet, für den eine hemmende Wirkung auf die Reninexpression und -freisetzung bei Stimulation des RAAS gezeigt wurde. Zum Ausschluss COX-1-vermittelter Effekte wurde der selektive COX-1-Inhibitor SC-560 herangezogen.

5.1 Zeitabhängigkeit der Effekte des COX-2-Inhibitors SC-58236

Um die Effekte des selektiven COX-2-Inhibitors SC-58236 genauer zu charakterisieren, wurde zunächst über 7 Tage die Beeinflussung der COX-Expression und der Prostaglandinfreisetzung, der Reninbildung und -freisetzung sowie des Blutdrucks durch SC-58236 im Vergleich zu unbehandelten Tieren untersucht. Es wurde hierfür einmal täglich eine Dosis von $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ SC-58236 über eine Schlundsonde verabreicht. Die letzte Applikation erfolgte zwei Stunden vor der Dekapitation.

5.1.1 Plasmakonzentration von SC-58236

Die Plasmakonzentration von SC-58236 bei einmal täglicher Applikation wurde über einen Zeitraum von 7 Tagen mittels HPLC bestimmt (Tab. 3). Innerhalb dieses Zeitraumes stieg die Plasmakonzentration kontinuierlich von $6,1 \pm 1,2 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ nach einmaliger Applikation bis auf eine Konzentration von $18,6 \pm 1,0 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ an. Dies entspricht einer molaren Konzentration von 15,2 bis $46,3 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$.

SC-58236	1 d	3 d	5 d	7 d
$\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	$6,1 \pm 1,2$	$10,4 \pm 0,7$	$14,9 \pm 1,4$	$18,6 \pm 1,0$
$\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	15,2	25,9	37,1	46,3

Tab. 3: Plasmakonzentration von SC-58236 nach Applikation von $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ für 1, 3, 5 und 7 Tage. Die letzte Applikation erfolgte jeweils zwei Stunden vor Dekapitation. Angegeben ist der MW \pm SEM von $n = 4$ Tieren.

5.1.2 Expression der COX-1- und COX-2-mRNA im Nierencortex

SC-58236 veränderte die Expressionsrate der COX-1-mRNA zu den untersuchten Zeitpunkten nicht (Abb. 7A).

Die Expression der COX-2-mRNA wurde durch einmalige Applikation von SC-58236 nicht beeinflusst. Ab dem dritten Tag der Behandlung mit SC-58236 wurde die Abundanz der COX-2-mRNA auf 260 % des Kontrollniveaus erhöht und blieb bis zum Tag 7 konstant auf dieser Höhe (Abb. 7B).

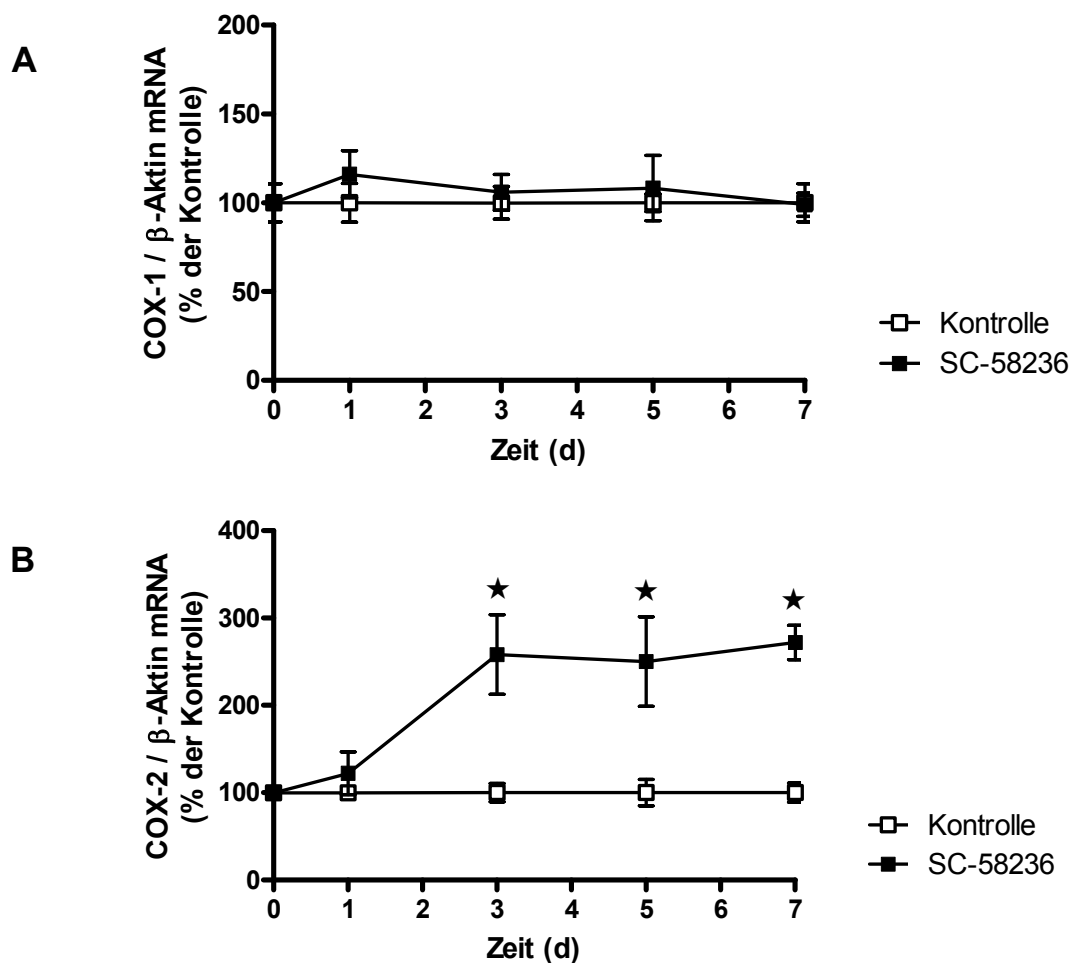


Abb. 7: Zeitabhängiger Effekt von $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ SC-58236 auf die Expression der COX-1-mRNA (A) und der COX-2-mRNA (B) im Nierencortex nach 1, 3, 5 und 7 Tagen. Die Bestimmung der mRNA erfolgte mittels Realtime RT-PCR und wurde auf β -Aktin standardisiert. Angegeben ist der MW \pm SEM von $n = 8$ Tieren. $\star p < 0,05$ vs. Kontrolle.

5.1.3 Expression des COX-1- und COX-2-Proteins im Nierencortex

Zusätzlich zur mRNA-Expression wurde der Einfluss von SC-58236 auf die Proteinexpression der COX-1 und COX-2 im Western Blot untersucht. Zur Kontrolle der einheitlichen Auftragsmenge diente die Bestimmung von β -Aktin.

Die Expression des COX-1-Proteins zeigte im Western Blot zu den verschiedenen Zeitpunkten keine Unterschiede auf (obere Bande, Abb. 8). Die Applikation von

SC-58236 führte nach drei Tagen zu einem deutlichen Anstieg des COX-2-Proteins, wobei nach 5 Tagen ein Maximum erreicht wurde (obere Bande, Abb. 8).

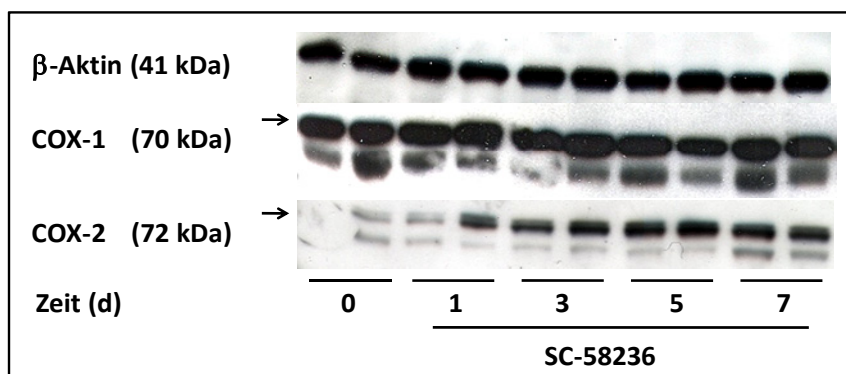


Abb. 8: Zeitabhängiger Effekt der Applikation von $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ SC-58236 auf die Proteinexpression von β -Aktin, COX-1 und COX-2 nach 1, 3, 5 und 7 Tagen im Nierencortex. Zur Analyse wurden $100 \mu\text{g}$ Gesamtproteinextrakt für die COX sowie $10 \mu\text{g}$ Gesamtproteinextrakt für β -Aktin im Western Blot verwendet.

5.1.4 Konzentration von PGE_2 in Nierencortex und Urin

Nach täglicher Gabe von SC-58236 wurde die Konzentration von PGE_2 im Nierencortex und 24 h-Sammelurin bestimmt. Bereits nach einmaliger Applikation von SC-58236 wurde die Gewebekonzentration von PGE_2 von $2,7 \pm 0,1$ auf $1,7 \pm 0,1$ ng pro mg Protein gesenkt, was einer Senkung auf 64 % des Kontrollniveaus entspricht. Diese Senkung blieb während der folgenden 6 Tage erhalten (Abb. 9A). Gleichermäßen wurde das über den Urin ausgeschiedene PGE_2 auf 49 % des Kontrollniveaus gesenkt. Hierbei sank die Konzentration an PGE_2 von $30,2 \pm 1,8$ auf $11,8 \pm 1,2$ ng pro Tag (Abb. 9B).

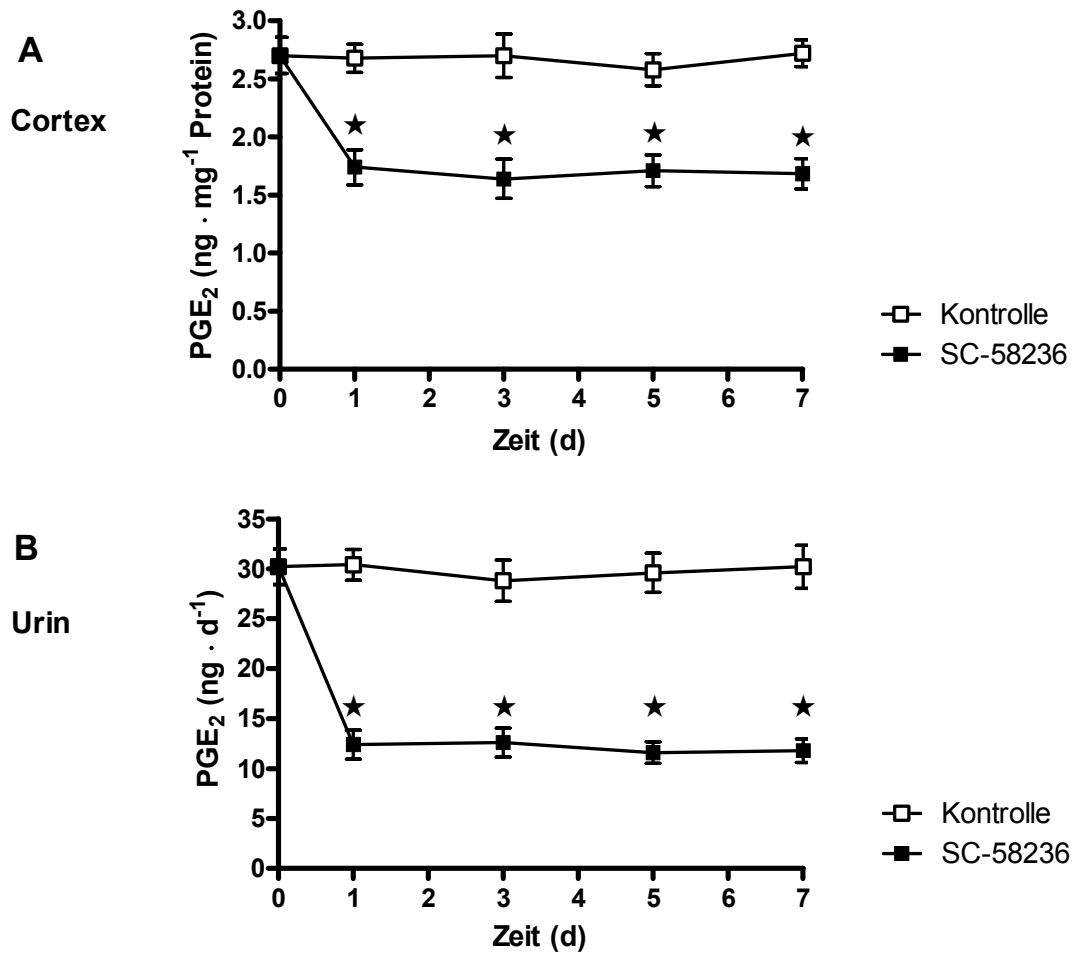


Abb. 9: Zeitabhängiger Effekt von $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ SC-58236 auf die Bildung von PGE₂ in Nierencortex (A) und Urin (B) nach 1, 3, 5 und 7 Tagen. Die Bestimmung der PGE₂-Konzentration erfolgte mittels ELISA. Angegeben ist der MW \pm SEM von $n = 8$ Tieren. $\star p < 0,05$ vs. Kontrolle.

Da die Senkung der PGE₂-Konzentration in Nierencortex und Urin gleichermaßen erfolgt, wird im Folgenden auf die Darstellung der PGE₂-Ausscheidung im Urin verzichtet.

5.1.5 Beeinflussung der Reninexpression und –freisetzung

Die Expression der Renin-mRNA im Nierencortex wurde durch ein- und dreimalige Applikation von SC-58236 nicht signifikant beeinflusst, wobei eine leichte Senkung der Renin-mRNA-Menge nach drei Tagen zu erkennen ist. Erst nach 5-tägiger Behandlung mit SC-58236 wurde die Abundanz der mRNA auf ca. 60 % des Kontrollniveaus gesenkt. Diese Senkung bestand auch nach 7 Tagen fort (Abb. 10A).

Die PRA betrug in den Kontrolltieren $6,0 \pm 0,4 \text{ ng Ang-I} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{mL}^{-1}$ und wurde nach ein bzw. drei Tagen nicht beeinflusst. Nach 5-tägiger Gabe von SC-58236 sank die PRA auf $3,5 \pm 0,3 \text{ ng Ang-I} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{mL}^{-1}$, was etwa 58 % des Kontrollniveaus entspricht (Abb. 10B).

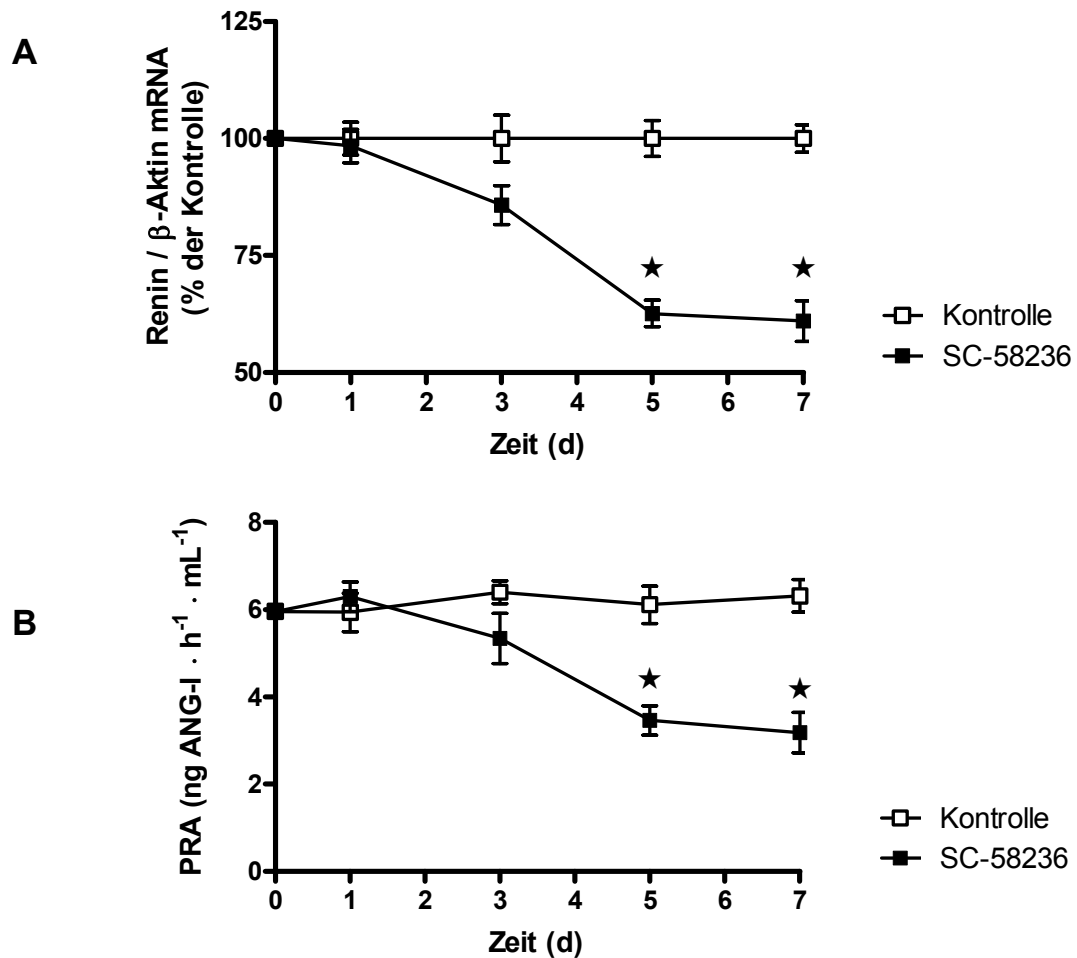


Abb. 10: Zeitabhängiger Effekt von $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ SC-58236 auf die Expression der Renin-mRNA im Nierencortex (A) und die Reninaktivität im Plasma (B) nach 1, 3, 5 und 7 Tagen. Die Bestimmung der mRNA erfolgte mittels Realtime RT-PCR und wurde auf β -Aktin standardisiert, die Bestimmung der PRA erfolgte mittels RIA. Angegeben ist der MW \pm SEM von $n = 8$ Tieren. $\star p < 0,05$ vs. Kontrolle.

5.1.6 Beeinflussung des systolischen Blutdrucks und der Herzfrequenz

Der systolische Blutdruck war im Vergleich zur Kontrollgruppe (129 ± 6 mmHg) in der behandelten Tiergruppe unverändert (136 ± 4 mmHg). Die Herzfrequenz betrug durch die Applikation von SC-58236 390 ± 11 , nach 7-tägiger Applikation von SC-58236 408 ± 16 Schläge pro Minute (Tab. 4).

Zeit (d)	sBP (mmHg)		HF (Schläge · min ⁻¹)	
	Kontrolle	SC-58236	Kontrolle	SC236
0	127 ± 3	126 ± 4	386 ± 10	390 ± 11
1	128 ± 4	129 ± 4	391 ± 12	387 ± 13
3	126 ± 4	127 ± 5	392 ± 14	410 ± 13
5	130 ± 5	129 ± 6	388 ± 9	394 ± 11
7	129 ± 6	136 ± 4	390 ± 11	408 ± 16

Tab. 4: Zeitabhängiger Effekt von $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ SC-58236 auf den systolischen Blutdruck (sBP) und die Herzfrequenz (HF) nach 1, 3, 5 und 7 Tagen. Die Bestimmung der Werte erfolgte an der Rattenschwanzarterie. Angegeben ist der MW \pm SEM von $n = 8$ Tieren.

5.1.7 Bestimmung der COX-2-Selektivität von SC-58236

Da über einen Applikationszeitraum von 7 Tagen ansteigende Plasmakonzentrationen von SC-58236 zu verzeichnen waren, wurde die Selektivität des COX-2-Inhibitors in seiner im Versuch vorliegenden Maximalkonzentration nach einer Woche anhand eines modifizierten air pouch-Modells bestimmt. SC-58236 verminderte die Bildung des über die COX-1 gebildeten TxA₂ im Vollblutassay nach *ex-vivo*-Gerinnung, gemessen als TxB₂, nicht signifikant. Hierbei sank die TxB₂-Konzentration von $205,4 \pm 49,1$ auf $139,7 \pm 14,7 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ nach 7-tägiger SC-58236-Applikation. Das ebenfalls hauptsächlich über COX-1 im Magen gebildete PGE₂ änderte sich im Vergleich zwischen Kontrolltieren und Versuchstieren nicht ($32,0 \pm 4,2$ zu $30,8 \pm 2,0 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$).

Die Bildung COX-2-abhängiger Prostaglandine im air pouch-Modell, gemessen als PGE₂ im Exsudat des Luftpolsters nach Carrageenan-Applikation, wurde jedoch bei einwöchiger Gabe von 10 mg · kg⁻¹ · d⁻¹ SC-58236 vollständig gehemmt. In der Kontrollgruppe wurde eine PGE₂-Konzentration von 763,8 ± 253,2 ng · mL⁻¹ gemessen, während die PGE₂-Konzentration nach Gabe von SC-58236 unterhalb der Nachweisgrenze des Assays lag (Abb. 11).

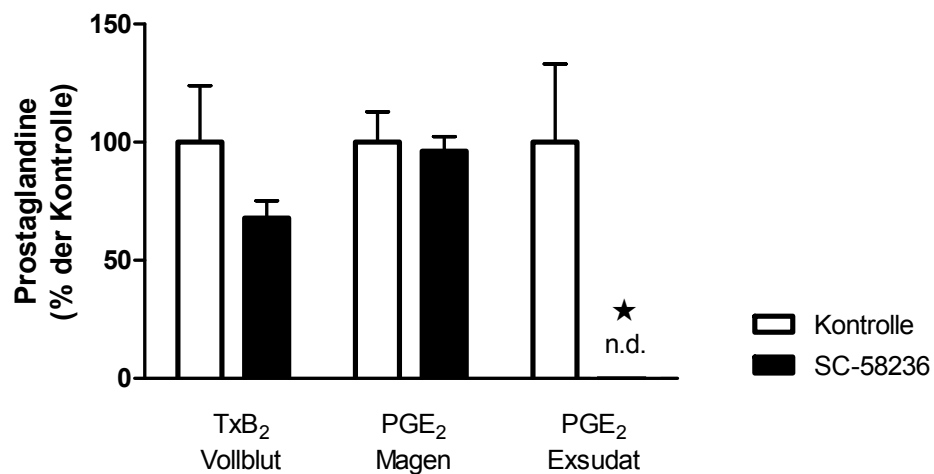


Abb. 11: Effekt einer einwöchigen Applikation von SC-58236 (10 mg · kg⁻¹ · d⁻¹) auf die Freisetzung von TxB₂ bei der Vollblutbildung, von PGE₂ im Magen und im entzündlichen Exsudat. Die Applikation von Carrageenan (2 mL einer 1 % igen Lösung m · V⁻¹ in isotonischer Kochsalzlösung) erfolgte zwei Stunden vor Dekapitation in das Luftpolster. Angegeben ist der MW ± SEM von n = 4 Tieren. n.d = nicht detektierbar. ★p < 0,05 vs. Kontrolle.

5.2 Einfluss von SC-58236 auf die Bildung und Freisetzung von Renin

5.2.1 Einfluss von SC-58236 auf die Stimulation des Renin-Systems durch ACE-Inhibitoren und AT₁-Rezeptorantagonisten

Durch Behandlung mit Hemmstoffen des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems, wie z. B. den ACE-Inhibitoren Captopril und Ramipril oder dem AT₁-Rezeptorantagonisten Candesartan, wird das durch Ang-II vermittelte negative Feedback des RAAS unterbrochen.

Es wurde der Effekt einer 7-tägigen Applikation von $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ SC-58236 auf die durch Captopril ($100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$), Ramipril ($10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$) sowie Candesartan ($15 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$) induzierte Reninexpression und -freisetzung untersucht.

5.2.1.1 Beeinflussung der Expression der COX-1- und COX-2-mRNA im Nierencortex

Die Expression der COX-1-mRNA wurde durch keine Behandlung beeinflusst (Abb. 12A), wohingegen die Expression der COX-2-mRNA im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle in allen Versuchsgruppen verstärkt wurde. Hierbei wurde durch die Gabe von Captopril die COX-2-mRNA-Abundanz nur leicht um den Faktor 1,5 erhöht, während durch zusätzliche Applikation des COX-2-Inhibitors SC-58236 ein Anstieg auf 210 % zu verzeichnen war. Die Applikation von Ramipril steigerte die COX-2-mRNA-Expression um den Faktor 3,4, Candesartan um den Faktor 3,0. Durch zusätzliche Applikation des COX-2-Inhibitors konnte bei beiden Versuchsgruppen keine weitere Erhöhung der COX-2-mRNA detektiert werden (Abb. 12B).

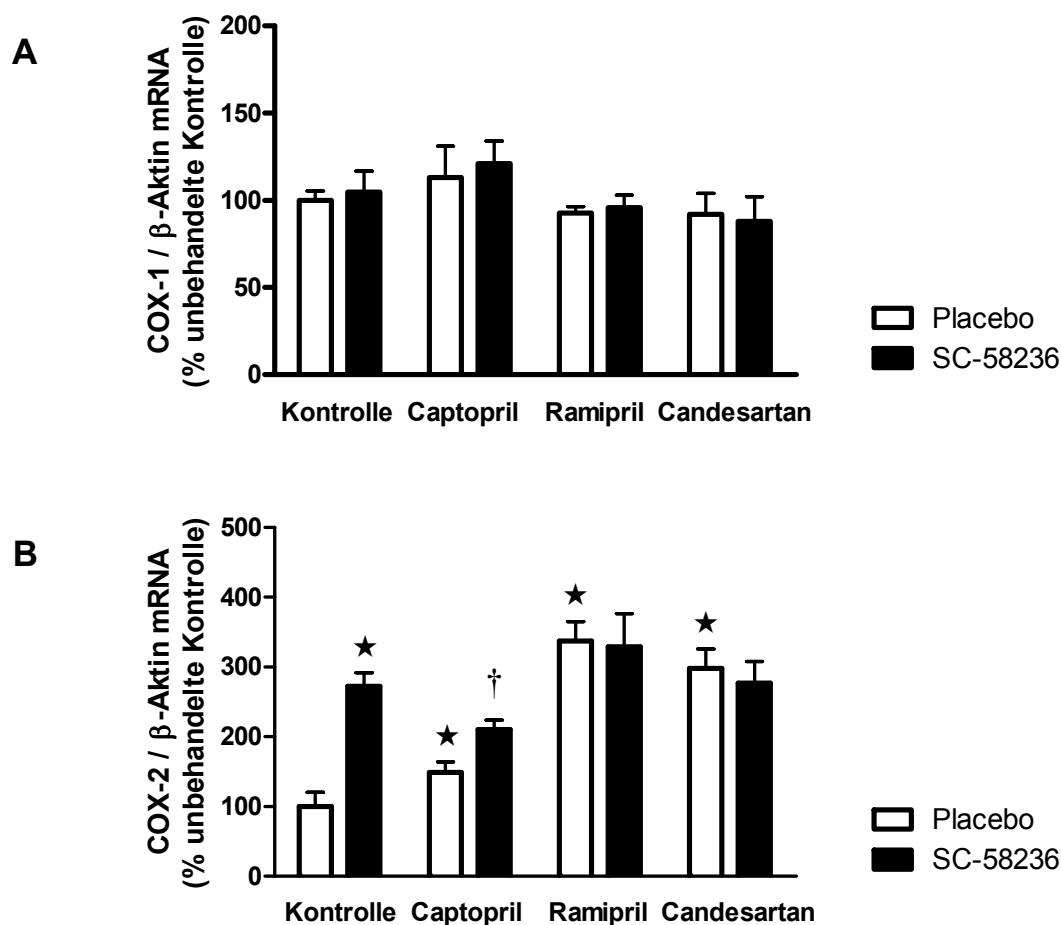


Abb. 12: Effekt der Applikation von $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ SC-58236 für 7 Tage in mit Captopril ($100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$), Ramipril ($10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$) bzw. Candesartan ($15 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$) über eine Woche behandelten Ratten auf die Expression der COX-1-mRNA (A) und COX-2-mRNA (B) im Nierencortex. Die Bestimmung der mRNA erfolgte mittels Realtime RT-PCR und wurde auf β -Aktin standardisiert. Angegeben ist der MW \pm SEM von $n = 8$ Tieren. $\star p < 0,05$ vs. unbehandelte Kontrollgruppe. $\dagger p < 0,05$ vs. jeweilige Placebogruppe.

5.2.1.2 Beeinflussung der Konzentration von PGE₂ im Nierencortex

Die Gewebekonzentration von PGE₂ im Nierencortex wurde durch die Behandlung der Tiere mit Captopril, Ramipril bzw. Candesartan über 7 Tage von $2,5 \pm 0,1$ auf $3,8 \pm 0,2$, $4,50 \pm 0,3$ bzw. $5,7 \pm 0,4$ ng pro mg Protein erhöht. Dies entspricht einer Erhöhung um die Faktoren 1,6, 1,9 bzw. 2,3 gegenüber der Kontrollgruppe. Zusätzliche Behandlung mit SC-58236 über den gesamten Zeitraum führte zu einer signifikanten Senkung der

Gewebekonzentration in allen Versuchsgruppen, wobei eine Konzentration von 1,8 bis $1,9 \pm 0,2$ ng PGE₂ pro mg Protein bestimmt wurde (Abb. 13).

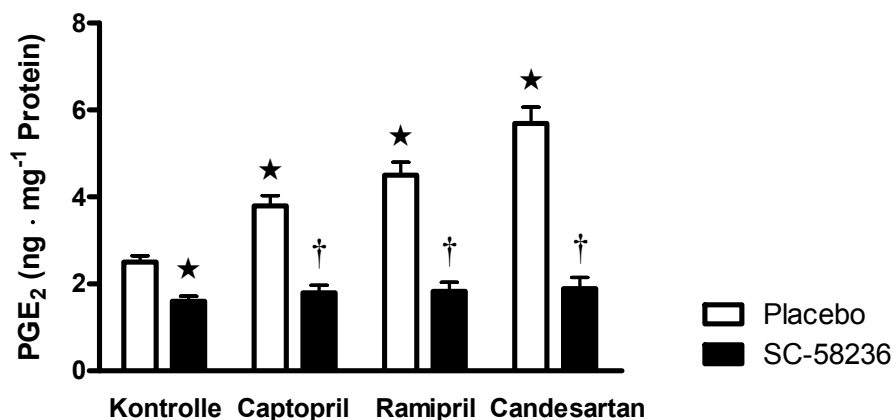


Abb. 13: Effekt der Applikation von $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ SC-58236 für 7 Tage in mit Captopril ($100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$), Ramipril ($10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$) bzw. Candesartan ($15 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$) über eine Woche behandelten Ratten auf die Bildung von PGE₂ im Nierencortex. Die Bestimmung der PGE₂-Konzentration erfolgte mittels ELISA. Angegeben ist der MW \pm SEM von $n = 8$ Tieren. * $p < 0,05$ vs. unbehandelte Kontrollgruppe. † $p < 0,05$ vs. jeweilige Placebogruppe.

5.2.1.3 Beeinflussung der Reninexpression und -freisetzung

Die Behandlung der Tiere mit den ACE-Inhibitoren Captopril bzw. Ramipril über 7 Tage erhöhte die Expression der Renin-mRNA im Nierencortex 1,9- bzw. 3,8-fach gegenüber der Kontrollgruppe, der AT₁-Rezeptorantagonist Candesartan um den Faktor 5,6. Die zusätzliche Verabreichung von SC-58236 senkte die Expressionsrate auf das 1,1-, 2,7- bzw. 3,2-fache der unbehandelten Kontrollgruppe, jedoch wurde im Vergleich zur SC-58236-behandelten Kontrollgruppe eine Steigerung der mRNA-Abundanz um die Faktoren 1,9, 4,9 bzw. 5,7 erzielt (Abb. 14A).

Etwas stärker erfolgte die Regulation der PRA. Hierbei wurde die PRA in den Versuchsgruppen Captopril, Ramipril und Candesartan um die Faktoren 5,4, 8,0 und 8,5 von $5,3 \pm 0,6$ auf $28,8 \pm 2,9$, $42,4 \pm 1,3$ bzw. $45,1 \pm 3,2$ ng Ang-I $\cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{mL}^{-1}$ gesteigert. Durch zusätzliche Gabe von SC-58236 war nur noch eine Erhöhung auf $13,8 \pm 1,3$, $24,5 \pm 1,7$ bzw. $25,4 \pm 1,1$ ng Ang-I $\cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{mL}^{-1}$ festzustellen. Dies entspricht einer

Steigerung um die Faktoren 2,6, 4,6 bzw. 4,8 gegenüber der unbehandelten Kontrollgruppe sowie 4,6, 8,2 bzw. 8,5 gegenüber der mit SC-58236 behandelten Kontrollgruppe (Abb. 14B).

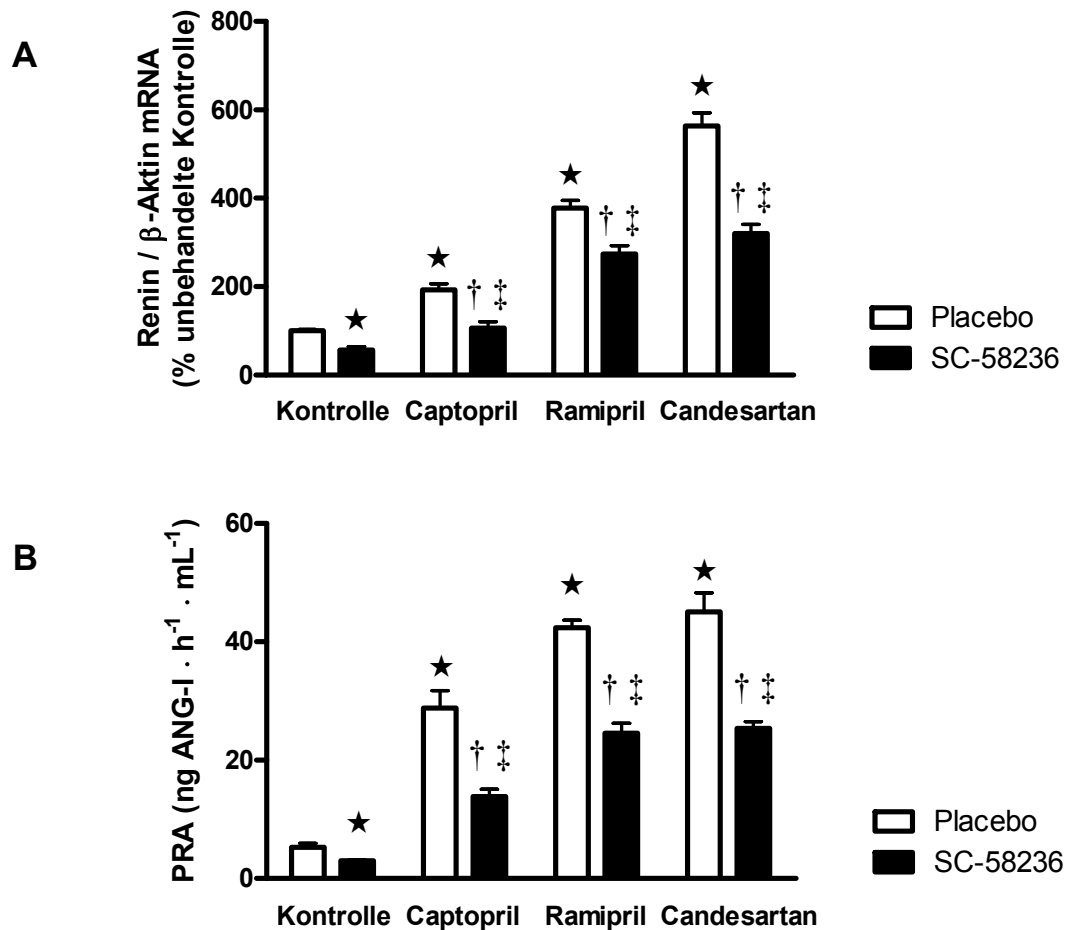


Abb. 14: Effekt der Applikation von $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ SC-58236 für 7 Tage in mit Captopril ($100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$), Ramipril ($10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$) bzw. Candesartan ($15 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$) über eine Woche behandelten Ratten auf die Expression der Renin-mRNA im Nierencortex (A) und die Reninaktivität im Plasma (B). Die Bestimmung der mRNA erfolgte mittels Realtime RT-PCR und wurde auf β -Aktin standardisiert, die Bestimmung der PRA erfolgte mittels RIA. Angegeben ist der MW \pm SEM von $n = 8$ Tieren. * $p < 0,05$ vs. unbehandelte Kontrollgruppe. † $p < 0,05$ vs. jeweilige Placebogruppe. ‡ $p < 0,05$ vs. SC-58236 7 d allein.

5.2.1.4 Beeinflussung des systolischen Blutdrucks und der Herzfrequenz

Die Behandlung mit Captopril, Ramipril bzw. Candesartan senkte den systolischen Blutdruck signifikant auf 109 ± 2 , 99 ± 3 bzw. 93 ± 2 mmHg. Bei zusätzlicher Verabreichung von SC-58236 wurde die blutdrucksenkende Wirkung der drei Arzneistoffe im Vergleich zu den jeweiligen unbehandelten Versuchsgruppen moderat auf 116 ± 2 , 109 ± 2 bzw. 103 ± 3 mmHg abgeschwächt.

Die Herzfrequenz wurde durch die Behandlung mit Captopril, Ramipril bzw. Candesartan von 390 ± 11 auf 422 ± 11 , 438 ± 13 bzw. 432 ± 14 Schläge pro Minute gesteigert. Zusätzliche Applikation von SC-58236 verminderte die Differenz zwischen der Herzfrequenz der Kontrolltiere und der behandelten Tieren leicht, aber nicht signifikant (Tab. 5).

	sBP (mmHg)		HF (Schläge · min ⁻¹)	
	Placebo	SC-58236	Placebo	SC-58236
Kontrolle	127 ± 5	133 ± 4	390 ± 11	406 ± 17
Captopril	109 ± 2 ★	116 ± 2 †‡	422 ± 11 ★	412 ± 14 ★
Ramipril	99 ± 3 ★	109 ± 2 †‡	438 ± 13 ★	422 ± 14 ★
Candesartan	93 ± 2 ★	103 ± 3 †‡	432 ± 14 ★	420 ± 11 ★

Tab. 5: Effekt der Applikation von $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ SC-58236 für 7 Tage auf den systolischen Blutdruck (sBP) und die Herzfrequenz (HF) während einer Behandlung mit Captopril ($100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$), Ramipril ($10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$) bzw. Candesartan ($15 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$) über eine Woche. Die Bestimmung der Werte erfolgte an der Rattenschwanzarterie. Angegeben ist der MW \pm SEM von $n = 8$ Tieren. ★ $p < 0,05$ vs. unbehandelte Kontrollgruppe. † $p < 0,05$ vs. jeweilige Placebogruppe. ‡ $p < 0,05$ vs. SC-58236 7 d allein.

5.2.2 Dosisabhängiger Effekt des COX-2-Inhibitors SC-58236 auf die Stimulation des Renin-Systems durch Candesartan

Um die Effekte des selektiven COX-2-Inhibitors SC-58236 weiter zu charakterisieren, wurde die dosisabhängige Beeinflussung der Plasmakonzentration, der COX-Expression und der Prostaglandinfreisetzung, der Reninbildung und -freisetzung sowie des Blutdrucks durch SC-58236 während der Applikation von Candesartan ($15 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$) untersucht. Es wurden hierfür täglich Dosierungen von 0,1, 1,0 und $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ SC-58236 über eine Schlundsonde verabreicht. Die letzte Applikation erfolgte in diesem Versuch am Tag vor der Dekapitation.

5.2.2.1 Plasmakonzentration von SC-58236

Die Plasmakonzentration von SC-58236 bei einmal täglicher Applikation in Dosierungen von 0,1, 1,0 und $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ wurde nach 7 Tagen mittels HPLC bestimmt. Dabei wurden molare Konzentrationen von 1,0, 6,7 sowie $28,6 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ gemessen (Tab. 6).

SC-58236	$0,1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$	$1,0 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$	$10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$
$\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	$0,4 \pm 0,1$	$2,7 \pm 0,4$	$11,5 \pm 1,1$
$\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	1,0	6,7	28,6

Tab. 6: Plasmakonzentration von SC-58236 nach 7-tägiger Applikation von 0,1, 1,0 und $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$. Die letzte Applikation erfolgte jeweils einen Tag vor Dekapitation. Angegeben ist der MW \pm SEM von $n = 4$ Tieren.

5.2.2.2 Beeinflussung der Expression der COX-1- und COX-2-mRNA im Nierencortex

In den untersuchten Konzentrationen veränderte SC-58236 die Expressionsrate der COX-1-mRNA nicht (Abb. 15A).

Die Expression der COX-2-mRNA wurde durch Applikation von Candesartan auf das 2,7-fache der Kontrolle gesteigert. Zusätzliche Applikation von SC-58236 veränderte die COX-2-mRNA-Abundanz in allen Dosierungen nicht (Abb. 15B).

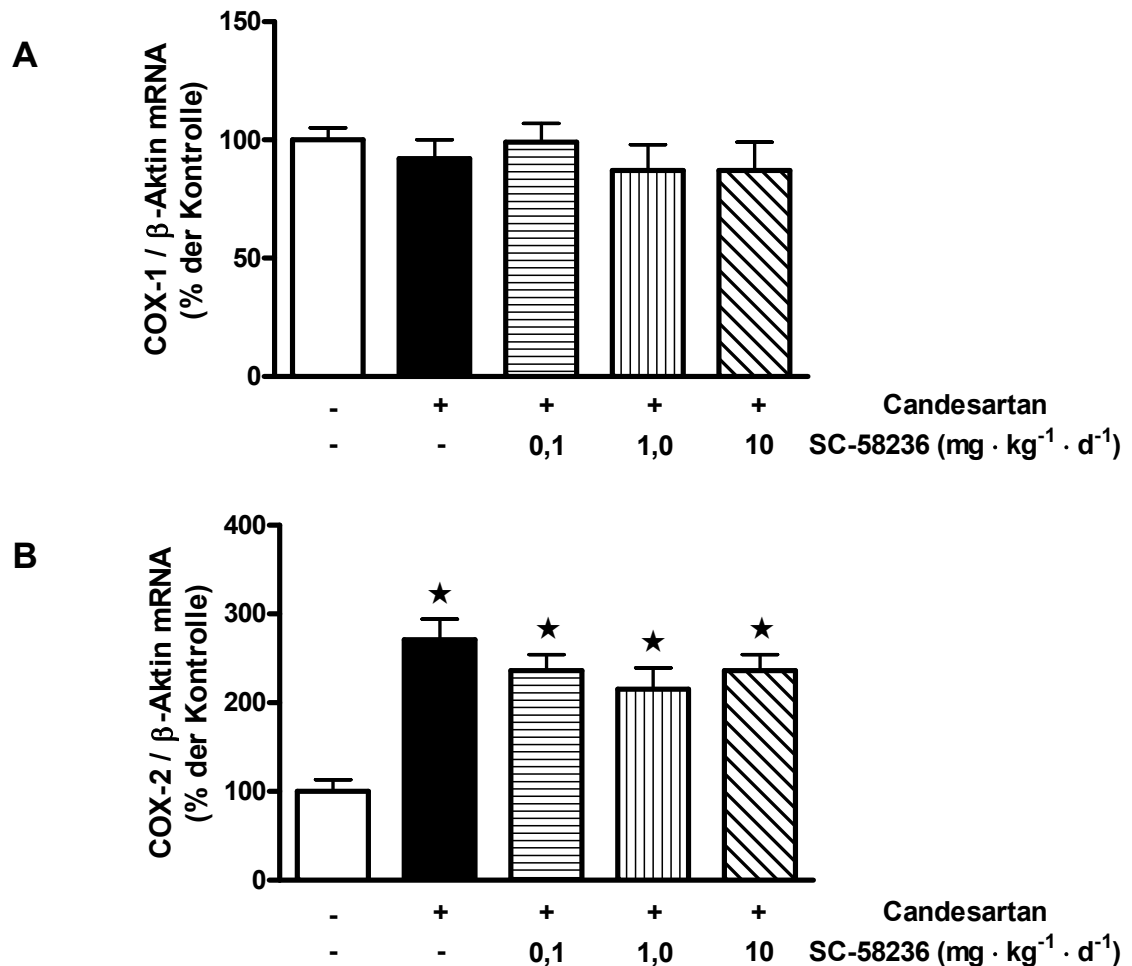


Abb. 15: Effekt der Applikation von SC-58236 in einer Dosierung von 0,1 bis 10 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ für 7 Tage in Kombination mit Candesartan ($15 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$) auf die Expression der COX-1-mRNA (A) und COX-2-mRNA (B) im Nierencortex. Die Bestimmung der mRNA erfolgte mittels Realtime RT-PCR und wurde auf β -Aktin standardisiert. Angegeben ist der MW \pm SEM von $n = 4$ Tieren. $\star p < 0,05$ vs. Kontrollgruppe.

5.2.2.3 Beeinflussung der Konzentration von PGE₂ im Nierencortex

Durch Applikation von Candesartan allein stieg die Gewebekonzentration von PGE₂ von $2,4 \pm 0,3$ auf $5,6 \pm 0,5$ ng pro mg Protein an. Zusätzliche Gabe von SC-58236 verminderte in der Dosierung von $0,1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ die PGE₂-Konzentration leicht auf $5,0 \pm 0,7$ ng pro mg Protein, eine signifikante Senkung wurde jedoch erst mit einer Dosierung von $1,0$ bzw. $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ erreicht. Hierbei wurden $3,4 \pm 0,6$ bzw. $1,5 \pm 0,5$ ng PGE₂ pro mg Protein gemessen (Abb. 16).

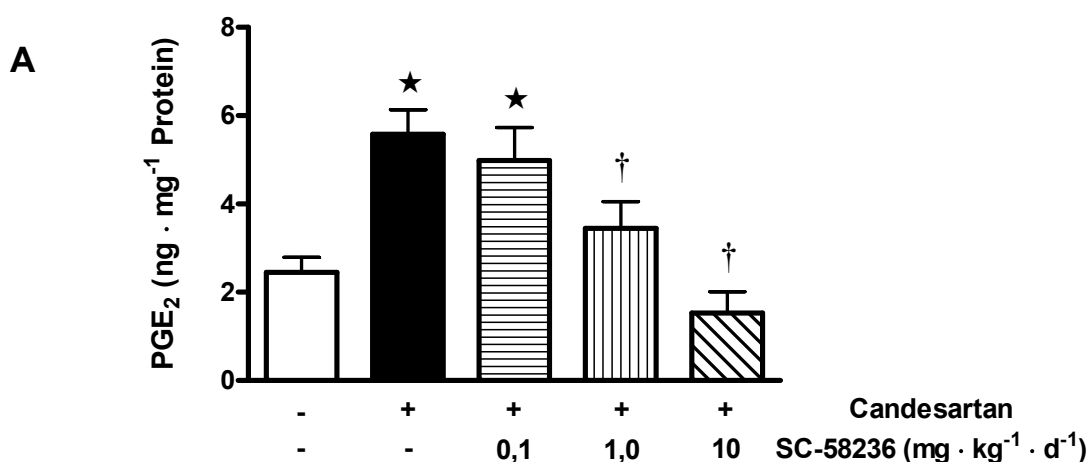


Abb. 16: Effekt der Applikation von SC-58236 in einer Dosierung von $0,1$ bis $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ für 7 Tage in Kombination mit Candesartan ($15 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$) auf die Bildung von PGE₂ im Nierencortex. Die Bestimmung der PGE₂-Konzentration erfolgte mittels ELISA. Angegeben ist der MW \pm SEM von $n = 4$ Tieren. ★ $p < 0,05$ vs. unbehandelte Gruppe während Normalsalzdiät. † $p < 0,05$ vs. Candesartan allein.

5.2.2.4 Beeinflussung der Reninexpression und -freisetzung

Die Expression der Renin-mRNA im Nierencortex wurde durch die Applikation von Candesartan auf etwa 690 % des Kontrollniveaus gesteigert. Zusätzliche Gabe von SC-58236 senkte die mRNA-Abundanz in einer Dosierung von $0,1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ nicht, die anderen Dosierungen auf ca. 400 % bzw. 315 % des Kontrollniveaus (Abb. 17A).

Die PRA betrug in den Kontrolltieren $5,7 \pm 0,8 \text{ ng Ang-I} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{mL}^{-1}$ und wurde durch Applikation von Candesartan auf $95,4 \pm 21,5 \text{ ng Ang-I} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{mL}^{-1}$ erhöht. Zusätzliche

Applikation von 0,1, 1,0 bzw. 10 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ SC-58236 senkte die PRA auf $79,9 \pm 16$, $63,6 \pm 11$ bzw. $44,8 \pm 12$ $\text{ng Ang-I} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{mL}^{-1}$, was etwa 85 %, 67 % bzw. 47 % des Niveaus entspricht, das durch Candesartan-Applikation allein erzielt wurde (Abb. 17B).

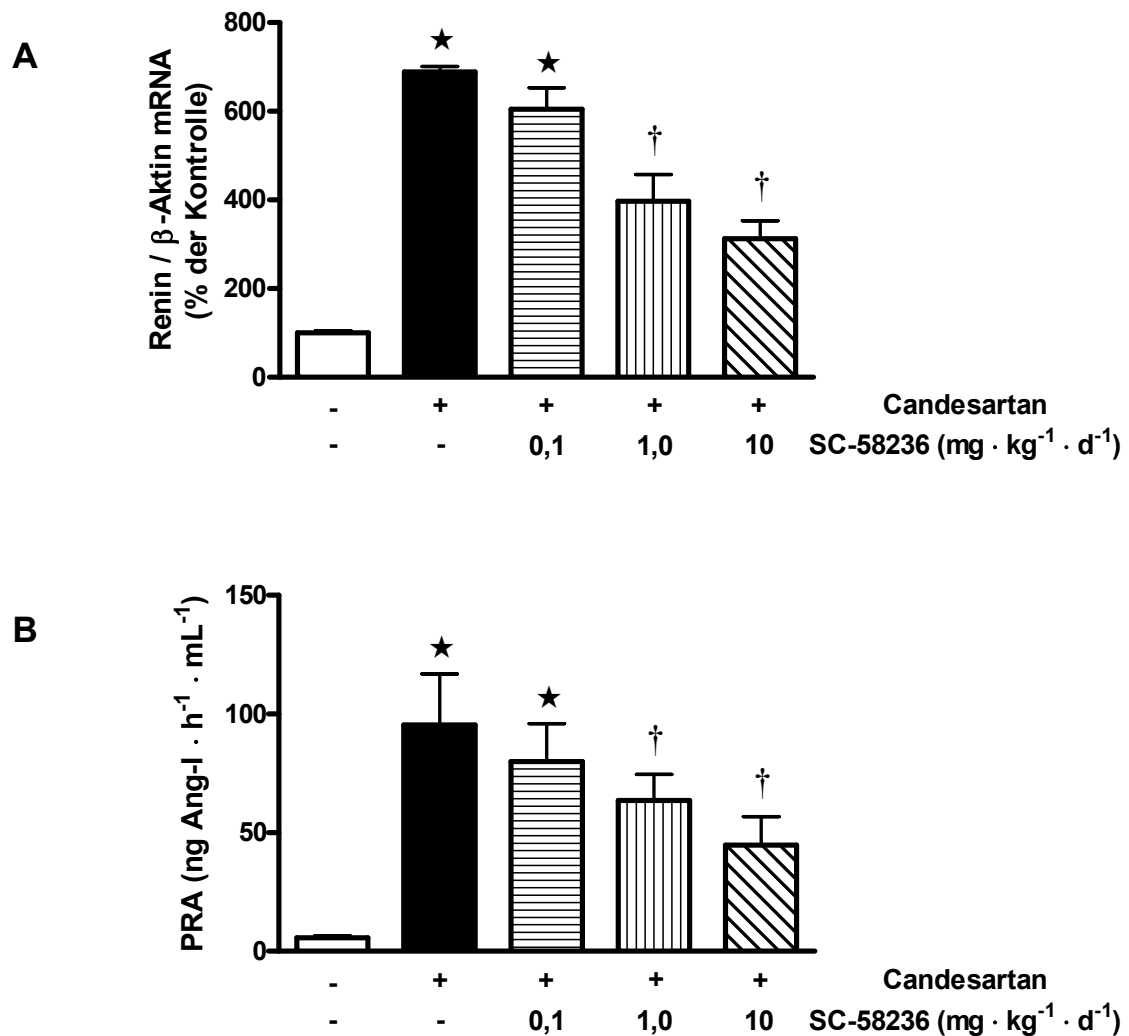


Abb. 17: Effekt der Applikation von SC-58236 in einer Dosierung von 0,1 bis 10 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ für 7 Tage in Kombination mit Candesartan ($15 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$) auf die Expression der Renin-mRNA im Nierencortex (A) und die Reninaktivität im Plasma (B). Die Bestimmung der mRNA erfolgte mittels Realtime RT-PCR und wurde auf β -Aktin standardisiert, die Bestimmung der PRA erfolgte mittels RIA. Angegeben ist der MW \pm SEM von $n = 8$ Tieren. $\star p < 0,05$ vs. unbehandelte Kontrollgruppe. $\dagger p < 0,05$ vs. Candesartan allein.

5.2.2.5 Beeinflussung des systolischen Blutdrucks und der Herzfrequenz

Die Behandlung mit Candesartan senkte den systolischen Blutdruck von 125 ± 4 auf 90 ± 3 mmHg. Die zusätzliche Applikation von SC-58236 beeinflusste diesen in einer Dosierung von 0,1 und 1,0 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ nicht. Die Applikation von 10 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ SC-58236 verminderte die blutdrucksenkende Wirkung von Candesartan (106 ± 2 mmHg).

Die Herzfrequenz wurde durch Applikation von Candesartan von 390 ± 10 auf 435 ± 12 Schläge pro Minute erhöht. Zusätzliche Gabe von SC-58236 beeinflusste diese in keiner Dosierung (Tab. 7).

	sBP (mmHg)	HF (Schläge $\cdot \text{min}^{-1}$)
Kontrolle	125 ± 4	390 ± 10
Candesartan	90 ± 3 ★	435 ± 12 ★
+ SC-58236 0,1	92 ± 1 ★	431 ± 11 ★
+ SC-58236 1,0	95 ± 2 ★	430 ± 14 ★
+ SC-58236 10	106 ± 2 †	425 ± 11 ★

Tab. 7: Effekt der Applikation von 0,1, 1,0 bzw. 10 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ SC-58236 für 7 Tage auf den systolischen Blutdruck (sBP) und die Herzfrequenz (HF) während gleichzeitiger Behandlung mit Candesartan ($15 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$). Die Bestimmung der Werte erfolgte an der Rattenschwanzarterie. Angegeben ist der MW \pm SEM von $n = 8$ Tieren. ★ $p < 0,05$ vs. Kontrollgruppe. † $p < 0,05$ vs. jeweilige Placebogruppe.

5.2.3 Einfluss von SC-58236 auf die salzabhängige Regulation des Renin-Systems

Es wurde der Einfluss von SC-58236 in einer Dosierung von $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ auf eine einwöchige Diät mit hoher ($8,0 \% \text{ NaCl m} \cdot \text{m}^{-1}$), normaler ($0,6 \% \text{ NaCl m} \cdot \text{m}^{-1}$) und niedriger ($0,02 \% \text{ NaCl m} \cdot \text{m}^{-1}$) Salzzufuhr untersucht.

5.2.3.1 Beeinflussung der Expression der COX-1- und COX-2-mRNA im Nierencortex

Die Expression der COX-1-mRNA blieb unter den verschiedenen Diäten unbeeinflusst, auch bei zusätzlicher Applikation von SC-58236 veränderte sich die Abundanz der COX-1-mRNA nicht (Abb. 18A).

Die COX-2-mRNA-Expression wurde durch eine Niedrigsalzdiät über 7 Tage um den Faktor 1,8 gesteigert, während eine Hochsalzdiät die Expression auf ca. 40 % des Kontrollniveaus senkte. Die zusätzliche Gabe des COX-2-Inhibitors erhöhte die Synthese der COX-2-mRNA bei Niedrigsalzdiät um den Faktor 2,1, bei normaler Salzzufuhr um den Faktor 2,7 gegenüber ihren jeweiligen Kontrollgruppen, während die COX-2-Expression unter Hochsalzdiät nur leicht erhöht war (Abb. 18B).

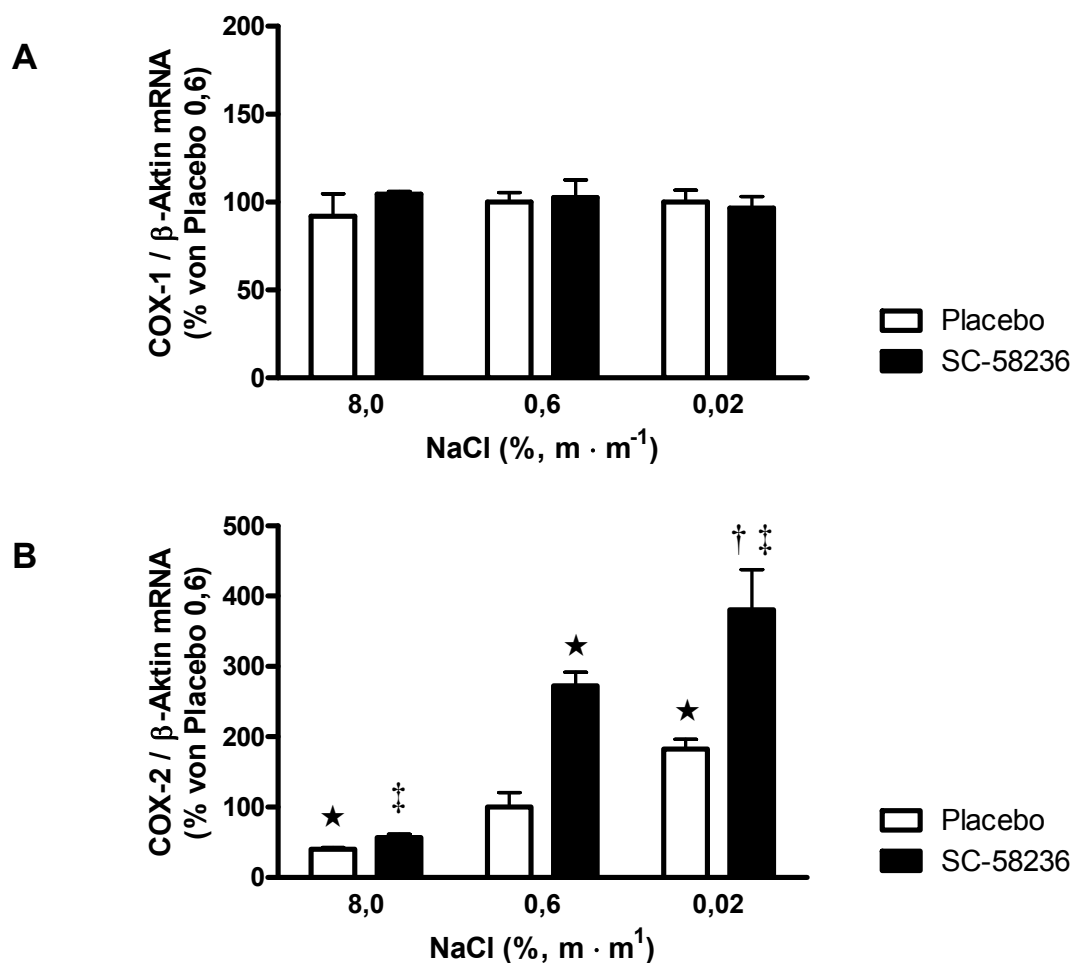


Abb. 18: Effekt der Applikation von $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ SC-58236 für 7 Tage auf die Expression der COX-1-mRNA (A) und die COX-2-mRNA (B) im Nierencortex während einer einwöchigen Hochsalzdiät ($8 \text{ \% NaCl m} \cdot \text{m}^{-1}$), Normalsalzdiät ($0,6 \text{ \% NaCl m} \cdot \text{m}^{-1}$) bzw. einer Niedrigsalzdiät ($0,02 \text{ \% NaCl m} \cdot \text{m}^{-1}$). Die Bestimmung der mRNA erfolgte mittels Realtime RT-PCR und wurde auf β -Aktin standardisiert. Angegeben ist der MW \pm SEM von $n = 8$ Tieren. $\star p < 0,05$ vs. unbehandelte Gruppe während Normalsalzdiät. $\dagger p < 0,05$ vs. unbehandelte Gruppe während Niedrigsalzdiät. $\ddagger p < 0,05$ vs. SC-58236 behandelte Gruppe während Normalsalzdiät

5.2.3.2 Beeinflussung der Konzentration von PGE₂ im Nierencortex

Eine einwöchige Hochsalzdiät senkte die Gewebekonzentration von PGE₂ in der Niere im Vergleich zu einer Normalsalzdiät um ca. 30 % von $2,5 \pm 0,1$ auf $1,8 \pm 0,1$ ng pro mg Protein, wohingegen eine Niedrigsalzdiät die PGE₂-Menge um den Faktor 1,4 auf $3,6 \pm 0,2$ ng pro mg Protein steigerte. Die zusätzlich erfolgte 7-tägige Behandlung mit

SC-58236 senkte die PGE₂-Konzentration im Nierencortex in allen Versuchsgruppen auf $1,2 \pm 0,1$ ng pro mg Protein in der Hochsalzgruppe bzw. $1,5 \pm 0,1$ ng pro mg Protein in den anderen beiden Untersuchungsgruppen (Abb. 19).

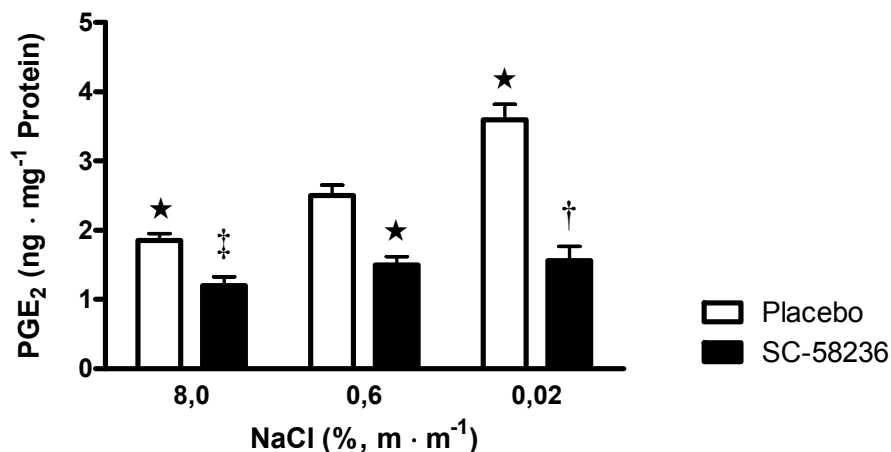


Abb. 19: Effekt der Applikation von $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ SC-58236 für 7 Tage auf die Bildung von PGE₂ im Nierencortex während einer einwöchigen Hochsalzdiät (8 % NaCl $\text{m} \cdot \text{m}^{-1}$), Normalsalzdiät (0,6 % NaCl $\text{m} \cdot \text{m}^{-1}$) bzw. einer Niedrigsalzdiät (0,02 % NaCl $\text{m} \cdot \text{m}^{-1}$). Die Bestimmung der PGE₂-Konzentration erfolgte mittels ELISA. Angegeben ist der MW \pm SEM von $n = 8$ Tieren. * $p < 0,05$ vs. unbehandelte Gruppe während Normalsalzdiät. † $p < 0,05$ vs. unbehandelte Gruppe während Niedrigsalzdiät. ‡ $p < 0,05$ vs. SC-58236 behandelte Gruppe während Hochsalzdiät.

5.2.3.3 Beeinflussung der Reninexpression und -freisetzung

Im Verhältnis zur Kontrollgruppe wurde die Expression der Renin-mRNA durch eine Hochsalzdiät auf 38 % gesenkt, während eine Niedrigsalzdiät die Renin-mRNA-Expression um den Faktor 2,2 erhöhte. Eine zusätzliche Applikation von SC-58236 über denselben Zeitraum beeinflusste die Bildung der Renin-mRNA unter der Hochsalzdiät nicht signifikant, während unter Normalsalz- und Niedrigsalzdiät eine Senkung der mRNA-Abundanz auf ca. 60 % der jeweiligen Placebogruppe festzustellen war (Abb. 20A).

Gleichermaßen wurde die PRA durch einwöchige erhöhte Salzzufuhr von $5,5 \pm 0,6$ ng Ang-I $\cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{mL}^{-1}$ auf 49 % ($2,6 \pm 0,2$ ng Ang-I $\cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{mL}^{-1}$) dieses Wertes gesenkt,

während eine verringerte Salzzufuhr eine Steigerung der PRA um den Faktor 2,3 auf $12,6 \pm 1,2 \text{ ng Ang-I} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{mL}^{-1}$ zur Folge hatte. Die zusätzliche Applikation von SC-58236 während der Hochsalzdiät veränderte die Reninfreisetzung nicht signifikant, während sowohl unter Normalsalzdiät als auch unter Niedrigsalzdiät eine Verminderung der PRA auf $3,5 \pm 0,4$ bzw. $8,6 \pm 0,3 \text{ ng Ang-I} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{mL}^{-1}$ der jeweiligen Placebogruppe festzustellen war. Dies entspricht einer Senkung um 37 % bzw. 32 % gegenüber den entsprechenden Placebogruppen und einer Steigerung der PRA während Niedrigsalzbehandlung gegenüber der mit SC-58236 allein behandelten Gruppen um den Faktor 2,4 (Abb. 20B).

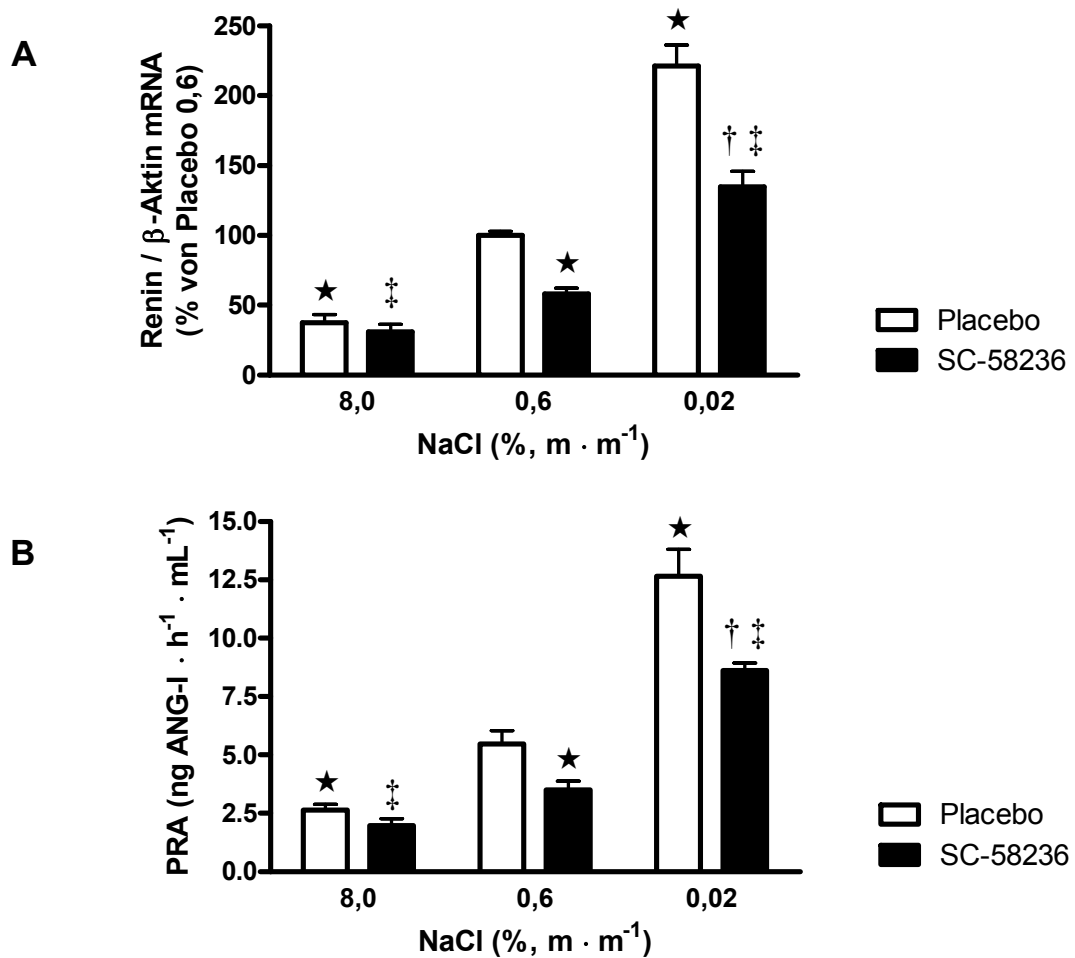


Abb. 20: Effekt der Applikation von $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ SC-58236 für 7 Tage auf die Expression der Renin-mRNA im Nierencortex (A) und die Reninaktivität im Plasma (B) während einer einwöchigen Hochsalzdiät (8 % NaCl $m \cdot m^{-1}$), Normalsalzdiät (0,6 % NaCl $m \cdot m^{-1}$) bzw. einer Niedrigsalzdiät (0,02 % NaCl $m \cdot m^{-1}$). Die Bestimmung der mRNA erfolgte mittels Realtime RT-PCR und wurde auf β -Aktin standardisiert, die Bestimmung der PRA erfolgte mittels RIA. Angegeben ist der MW \pm SEM von $n = 8$ Tieren. * $p < 0,05$ vs. unbehandelte Gruppe während Normalsalzdiät. † $p < 0,05$ vs. unbehandelte Gruppe während Niedrigsalzdiät. ‡ $p < 0,05$ vs. SC-58236 behandelte Gruppe während Normalsalzdiät.

5.2.3.4 Beeinflussung des systolischen Blutdrucks und der Herzfrequenz

Der systolische Blutdruck wurde durch die verschiedenen Salzdiäten nicht beeinflusst. Bei zusätzlicher Applikation von SC-58236 wurde der Blutdruck nur in der Hochsalzdiätgruppe auf 143 ± 3 mmHg erhöht. Die Herzfrequenz wurde in keiner der untersuchten Gruppen beeinflusst (Tab. 8).

NaCl ($m \cdot m^{-1}$)	sBP (mmHg)		HF (Schläge \cdot min $^{-1}$)	
	Placebo	SC-58236	Placebo	SC-58236
8,0	135 ± 4	143 ± 3 ★	398 ± 9	405 ± 11
0,6	127 ± 4	133 ± 5	390 ± 10	398 ± 12
0,02	126 ± 5	132 ± 2	410 ± 11	408 ± 9

Tab. 8: Effekt der Applikation von $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ SC-58236 für 7 Tage auf den systolischen Blutdruck (sBP) und die Herzfrequenz (HF) während einer einwöchigen Hochsalzdiät (8 % NaCl $m \cdot m^{-1}$), Normalsalzdiät (0,6 % NaCl $m \cdot m^{-1}$) bzw. einer Niedrigsalzdiät (0,02 % NaCl $m \cdot m^{-1}$). Die Bestimmung der Werte erfolgte an der Rattenschwanzarterie. Angegeben ist der MW \pm SEM von $n = 8$ Tieren. ★ $p < 0,05$ vs. unbehandelte Gruppe während Normalsalzdiät.

5.2.4 Einfluss von SC-58236 auf die Stimulation des Renin-Systems durch das Schleifendiuretikum Furosemid

Durch die Blockade des $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-2Cl}^-$ -Cotransporters mit Furosemid wird der Salztransport an den Macula densa-Zellen der Niere gesenkt.

Es wurde der zeitabhängige Effekt einer Gabe von SC-58236 ($10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$) über zwei bzw. 7 Tage auf die durch Furosemid ($12 \text{ mg} \cdot \text{d}^{-1}$) induzierte Reninexpression und -freisetzung untersucht.

5.2.4.1 Beeinflussung der Expression der COX-1- und COX-2-mRNA im Nierencortex

Die Expression der COX-1-mRNA blieb in sämtlichen Versuchsgruppen im Vergleich zur Kontrollgruppe unbeeinflusst (Abb. 21A).

Die Genexpression der COX-2-mRNA wurde durch Infusion von Furosemid allein um den Faktor 2,0 erhöht. Zusätzliche Gabe von SC-58236 über zwei bzw. 7 Tage erhöhte die Expression der COX-2-mRNA nicht (Abb. 21B).

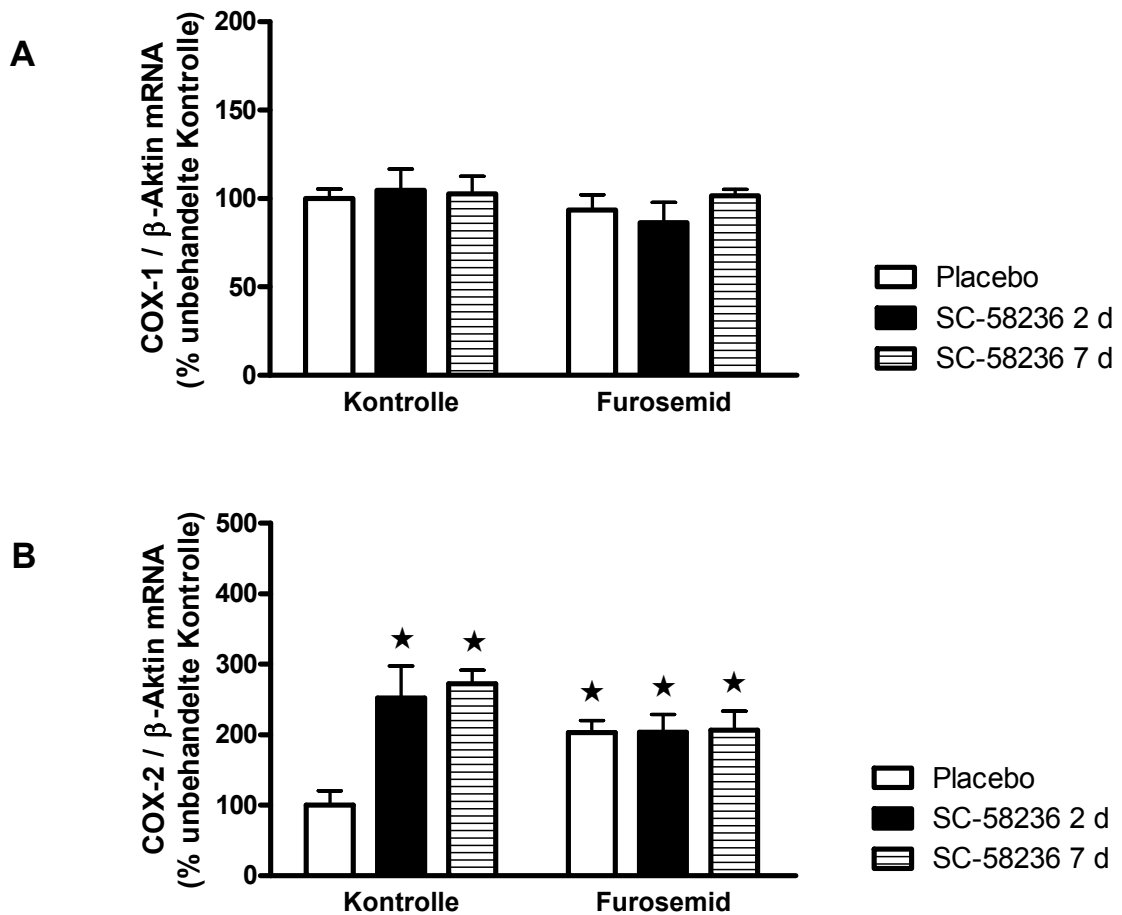


Abb. 21: Effekt der Applikation von $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ SC-58236 für zwei oder 7 Tage in Kombination mit einer zweitägigen Infusion von Furosemid ($12 \text{ mg} \cdot \text{d}^{-1}$) auf die Expression der COX-1-mRNA (A) und COX-2-mRNA (B) im Nierencortex. Die Bestimmung der mRNA erfolgte mittels Realtime RT-PCR und wurde auf β -Aktin standardisiert. Angegeben ist der MW \pm SEM von $n = 8$ Tieren. $\star p < 0,05$ vs. unbehandelte Kontrollgruppe.

5.2.4.2 Beeinflussung der Konzentration von PGE₂ im Nierencortex

Die Konzentration von PGE₂ im Nierencortex wurde durch zweitägige Infusion von Furosemid etwa um den Faktor 2 von $2,4 \pm 0,1$ auf $4,8 \pm 0,3$ ng pro mg Protein im Vergleich zur Kontrollgruppe erhöht. Durch kombinierte Gabe von SC-58236 und Furosemid für zwei Tage verminderte sich die PGE₂-Konzentration signifikant um 58 % auf $2,0 \pm 0,1$ ng pro mg Protein. Eine zusätzliche Vorinkubation von 5 Tagen mit SC-58236 ließ die PGE₂-Konzentration auf $1,8 \pm 0,2$ ng pro mg Protein sinken (Abb. 22).

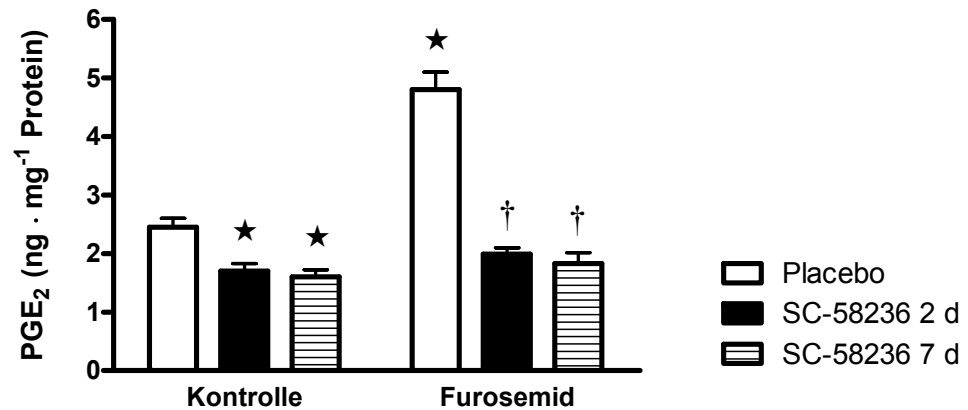


Abb. 22: Effekt der Applikation von $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ SC-58236 für zwei oder 7 Tage in Kombination mit einer zweitägigen Infusion von Furosemid ($12 \text{ mg} \cdot \text{d}^{-1}$) auf die Bildung von PGE₂ im Nierencortex. Die Bestimmung der PGE₂-Konzentration erfolgte mittels ELISA. Angegeben ist der MW \pm SEM von $n = 8$ Tieren. ★ $p < 0,05$ vs. unbehandelte Kontrollgruppe. † $p < 0,05$ vs. Furosemid allein.

5.2.4.3 Beeinflussung der Reninexpression und -freisetzung

Eine 48-stündige Infusion von Furosemid allein erhöhte die Renin-mRNA-Expression signifikant um den Faktor 3,0. Die gleichzeitige Applikation von SC-58236 ließ die mRNA-Abundanz nur noch auf 175 % der unbehandelten Kontrolle ansteigen, während eine Vorbehandlung mit dem COX-2-Inhibitor diese nahezu auf Kontrollniveau (117 %) sinken ließ. Bezogen auf die jeweilige SC-58236-Kontrollgruppe erfolgte demnach nur noch ein Anstieg der Renin-mRNA-Expression um den Faktor 2,1 (Abb. 23A).

Die PRA wurde stärker beeinflusst und stieg durch Furosemid-Infusion von $5,24 \pm 0,6$ auf $31,0 \pm 2,9 \text{ ng Ang-I} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{mL}^{-1}$ an. Wie bereits vorher gezeigt, wurde die PRA durch zweitägige Verabreichung von SC-58236 nicht beeinflusst, während eine 7-tägige Gabe diese signifikant auf $3,2 \pm 0,2 \text{ ng Ang-I} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{mL}^{-1}$ senkte. Durch zusätzliche Applikation von Furosemid erhöhte sich die PRA auf $14,0 \pm 0,8$ bzw. $8,8 \pm 0,7 \text{ ng Ang-I} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{mL}^{-1}$. Dies entspricht einer Senkung gegenüber alleiniger Furosemid-Infusion auf 45 % bzw. 28 % des Ausgangswertes (Abb. 23B).

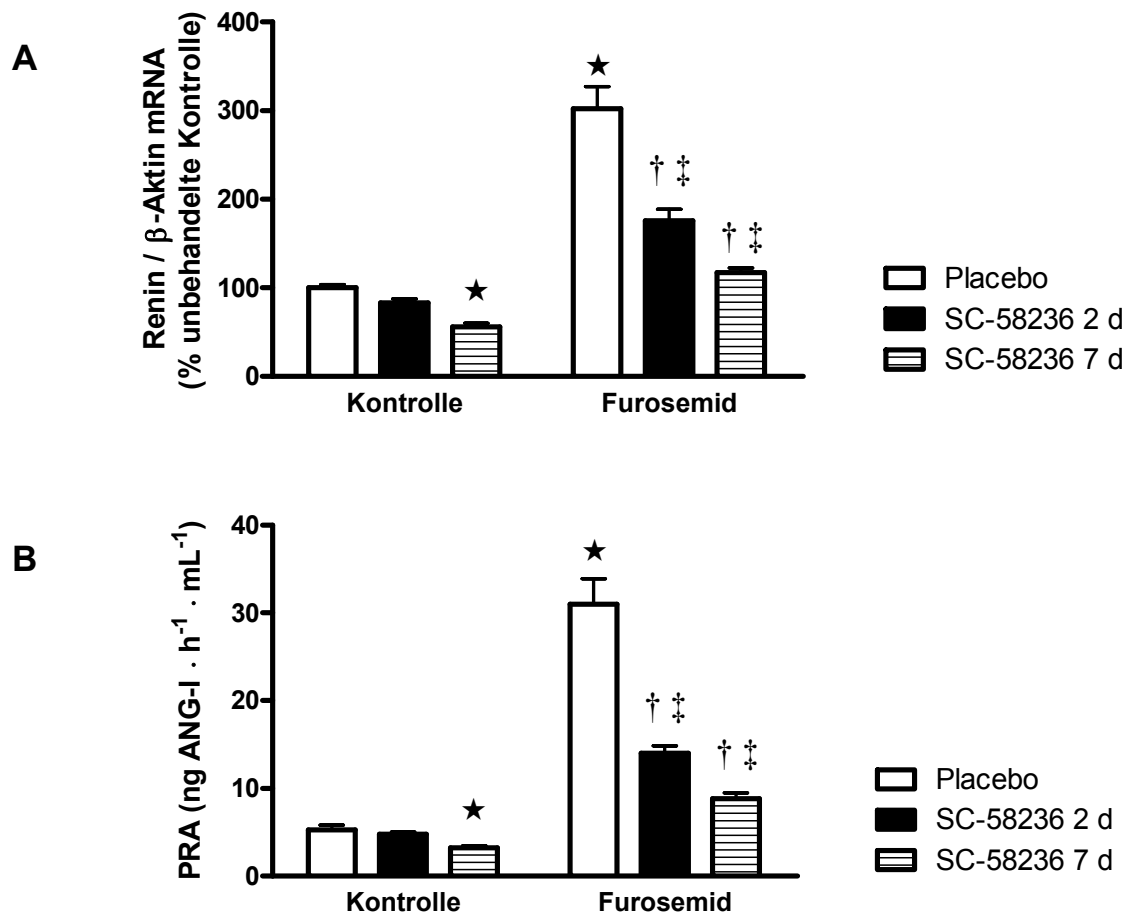


Abb. 23: Effekt der Applikation von $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ SC-58236 für zwei oder 7 Tage in Kombination mit einer zweitägigen Infusion von Furosemid ($12 \text{ mg} \cdot \text{d}^{-1}$) auf die Expression der Renin-mRNA im Nierencortex (A) und die Reninaktivität im Plasma (B). Die Bestimmung der mRNA erfolgte mittels Realtime RT-PCR und wurde auf β -Aktin standardisiert, die Bestimmung der PRA erfolgte mittels RIA. Angegeben ist der MW \pm SEM von $n = 8$ Tieren. $\star p < 0,05$ vs. unbehandelte Kontrollgruppe. $\dagger p < 0,05$ vs. Furosemid allein. $\ddagger p < 0,05$ vs. jeweilige SC-58236-Kontrollgruppe.

5.2.4.4 Beeinflussung des systolischen Blutdrucks und der Herzfrequenz

Weder der systolische Blutdruck noch die Herzfrequenz wurden in einer der Versuchsgruppen signifikant verändert (Tab. 9).

	sBP (mmHg)		HF (Schläge / min)	
	Placebo	Furosemid	Placebo	Furosemid
Kontrolle	127 ± 5	120 ± 5	390 ± 12	405 ± 8
SC-58236 2 d	130 ± 3	123 ± 4	393 ± 8	410 ± 12
SC-58236 7 d	135 ± 6	122 ± 5	408 ± 12	407 ± 11

Tab. 9: Effekt der Applikation von $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ SC-58236 für zwei oder 7 Tage in Kombination mit einer zweitägigen Infusion von Furosemid ($12 \text{ mg} \cdot \text{d}^{-1}$) auf den systolischen Blutdruck (sBP) und die Herzfrequenz (HF). Die Bestimmung der Werte erfolgte an der Rattenschwanzarterie. Angegeben ist der MW ± SEM von $n = 8$ Tieren.

5.2.5 Einfluss von SC-58236 auf die Aktivierung des Renin-Systems durch eine Nierenarterienstenose

Im 2K-1C Modell wurde der Effekt des COX-2-Inhibitors SC-58236 in einer Dosierung von $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ auf einen verminderten renalen Perfusionsdruck durch Nierenarterienstenose in der geklippten sowie in der kontralateralen Niere untersucht.

5.2.5.1 Beeinflussung der Expression der COX-1- und COX-2-mRNA im Nierencortex

Im 2K-1C Modell wurde die Expression der COX-1-mRNA in keiner der untersuchten Gruppen signifikant verändert (Abb. 24A).

Die Expression der COX-2-mRNA wurde in der geklippten Niere um den Faktor 2,5 erhöht, während in der kontralateralen Niere eine Verminderung der mRNA-Abundanz auf 33 % festzustellen war. Die Applikation von SC-58236 für zwei oder 7 Tage bewirkte einen Anstieg der COX-2-mRNA-Abundanz auf das 2,5- bzw. 2,7-fache. Wurden die geklippten Tiere gleichzeitig mit dem COX-2-Inhibitor behandelt, konnte in der geklippten Niere eine Erhöhung der Genexpression auf 320 % festgestellt werden, die durch Vorbehandlung nicht weiter beeinflusst wurde. Kontralateral erfolgte durch gleichzeitige Applikation von SC-58236 eine Verdoppelung der COX-2-mRNA-Abundanz, die durch Vorinkubation bis auf das Niveau der unbehandelten Kontrolle anstieg (Abb. 24B).

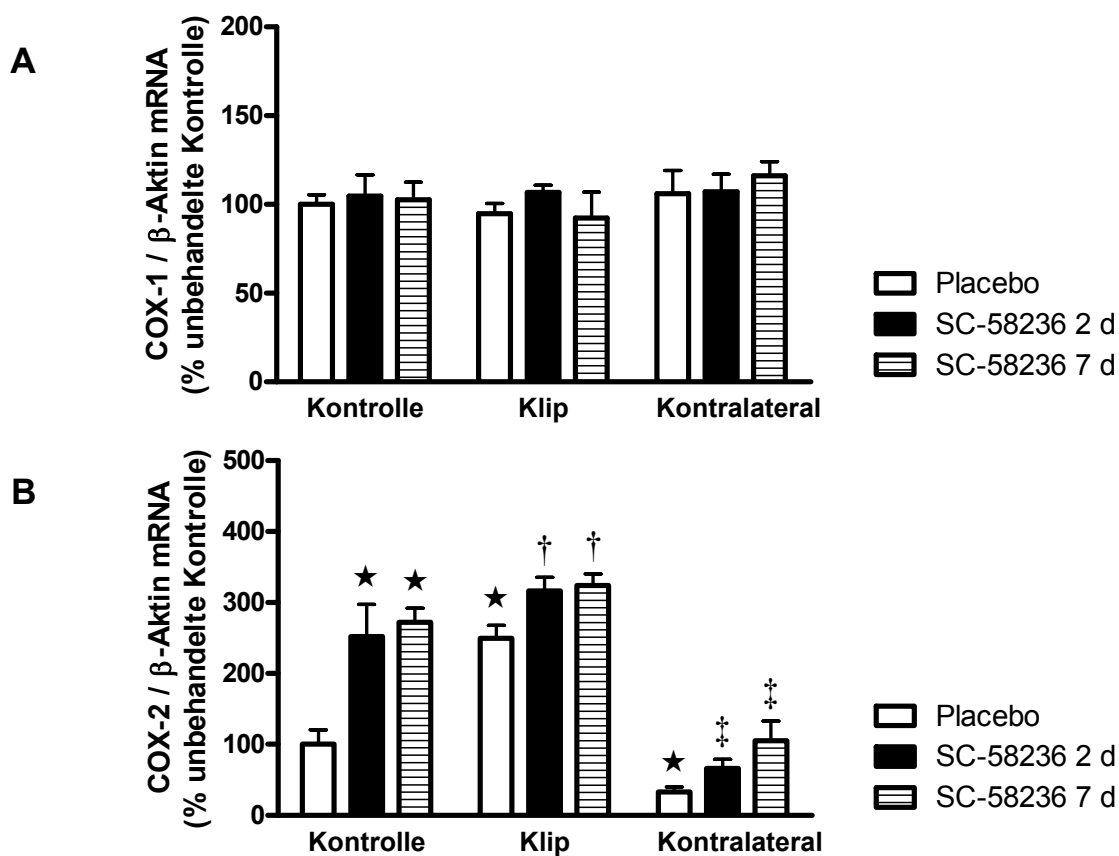


Abb. 24: Effekt der Applikation von $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ SC-58236 für zwei oder 7 Tage in Kombination mit einer zweitägigen linksseitigen Nierenarterienstenose (2K-1C) auf die Expression der COX-1-mRNA (A) und die COX-2-mRNA (B) im Nierencortex. Gezeigt sind die Werte der geklippten und der kontralateralen Niere. Die Bestimmung der mRNA erfolgte mittels Realtime RT-PCR und wurde auf β -Aktin standardisiert. Angegeben ist der MW \pm SEM von $n = 8$ Tieren. $\star p < 0,05$ vs. unbehandelte Kontrollgruppe. $\dagger p < 0,05$ vs. unbehandelte Klip-Gruppe. $\ddagger p < 0,05$ vs. unbehandelte Kontralateral-Gruppe.

5.2.5.2 Beeinflussung der Expression des COX-1- und COX-2-Proteins im Nierencortex

Zusätzlich zur mRNA-Expression wurde der Einfluss von SC-58236 auf die Proteinexpression der COX-1 und COX-2 bei zweitägiger linksseitiger Nierenarterienstenose (2K-1C) im Western Blot untersucht. Zur Kontrolle der einheitlichen Auftragsmenge diente die Bestimmung von β -Aktin.

Die Expression des COX-1-Proteins zeigte im Western Blot zu den verschiedenen Zeitpunkten keine Unterschiede auf. Die Applikation von SC-58236 über zwei Tage führte zu einem deutlichen Anstieg des COX-2-Proteins. In der geklippten Niere wurde nach 48 h bereits ein Anstieg des COX-2-Proteins deutlich. In der kontralateralen Niere verminderte sich die Proteinexpression. Zusätzliche Applikation von SC-58236 verstärkte in beiden Nieren die Expression der COX-2, ohne jedoch das Niveau der SC-58236-Kontrolle zu erreichen (Abb. 25).

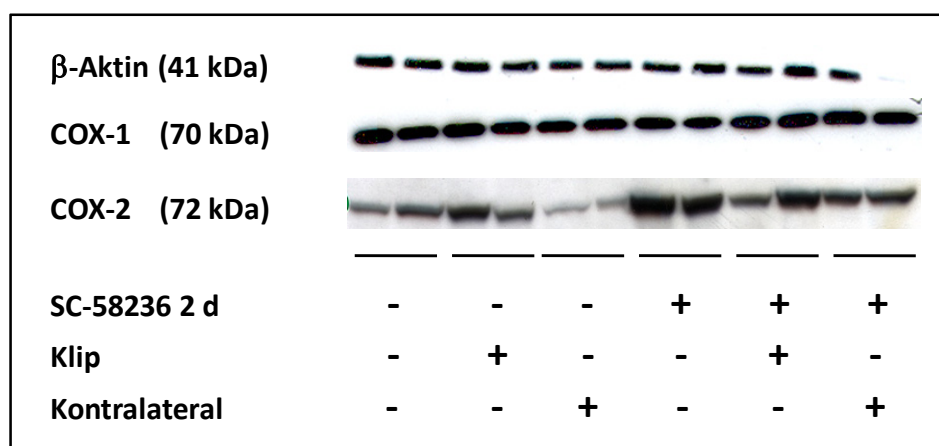


Abb. 25: Effekt der Applikation von $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ SC-58236 für zwei Tage in Kombination mit einer zweitägigen linksseitigen Nierenarterienstenose (2K-1C) auf die Proteinexpression von β -Aktin, COX-1 und COX-2 im Nierencortex. Gezeigt sind Banden für die geklippte und die kontralaterale Niere. Zur Analyse wurden $100 \mu\text{g}$ Gesamtproteinextrakt für die COX sowie $10 \mu\text{g}$ Gesamtproteinextrakt für β -Aktin im Western Blot verwendet.

5.2.5.3 Beeinflussung der Konzentration von PGE₂ im Nierencortex

Eine Stenose der linken Nierenarterie erhöhte die PGE₂-Konzentration in der geklippten Niere im Vergleich zu unbehandelten Kontrolltieren um den Faktor 1,7 auf $4,3 \pm 0,3 \text{ ng pro mg Protein}$. Zusätzliche Behandlung mit SC-58236 über die gleiche Zeit senkte die Gewebekonzentration von PGE₂ in der Niere genauso stark ($2,0 \pm 0,2 \text{ ng pro mg Protein}$) wie eine zusätzliche Vorbehandlung mit SC-58236 über 5 Tage ($1,8 \pm 0,2 \text{ ng pro mg Protein}$). In der kontralateralen Niere wurden gleiche Mengen an PGE₂ wie in der unbehandelten Kontrollgruppe bestimmt ($2,9 \pm 0,2 \text{ ng pro mg Protein}$). Die

gleichzeitige Applikation von bzw. Vorinkubation mit dem COX-2-Inhibitor verminderte die gemessene Gewebekonzentration auf $1,8 \pm 0,1$ bzw. $1,6 \pm 0,1$ ng PGE₂ pro mg Protein (Abb. 26).

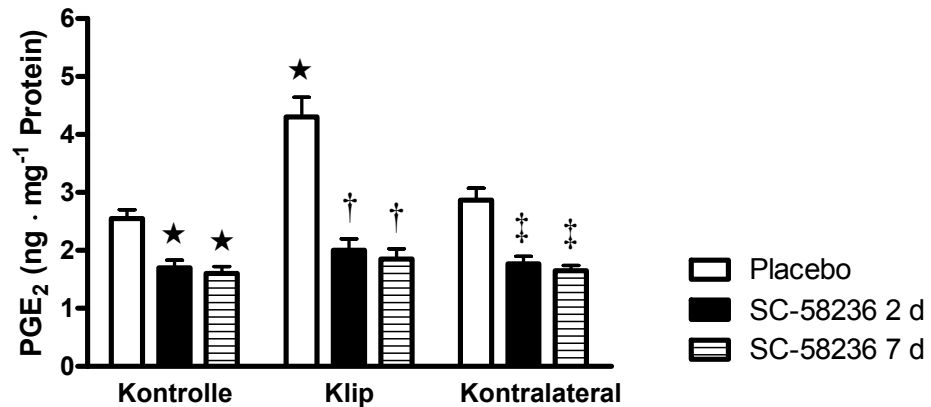


Abb. 26: Effekt der Applikation von $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ SC-58236 für zwei oder 7 Tage Kombination mit einer zweitägigen linksseitigen Nierenarterienstenose (2K-1C) auf die Bildung von PGE₂ im Nierencortex der geklippten Niere. Gezeigt sind die Werte der geklippten und der kontralateralen Niere. Die Bestimmung der PGE₂-Konzentration erfolgte mittels ELISA. Angegeben ist der MW \pm SEM von $n = 8$ Tieren. * $p < 0,05$ vs. unbehandelte Kontrollgruppe. † $p < 0,05$ vs. unbehandelte Klip-Gruppe. ‡ $p < 0,05$ vs. unbehandelte Kontralateral-Gruppe.

5.2.5.4 Beeinflussung der Reninexpression und -freisetzung

Die Expression der Renin-mRNA wurde durch 48-stündige Stenose in der geklippten Niere um den Faktor 2,3 im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle erhöht. Gleichzeitige Gabe von SC-58236 änderte die mRNA-Expression nicht signifikant. Erst durch Vorbehandlung mit SC-58236 erfolgte eine Senkung der Renin-mRNA-Expression um 38 %. Dies entspricht einem Anstieg der mRNA-Abundanz gegenüber der für 7 Tage behandelten SC-58236 Gruppe um den Faktor 2,3. In der kontralateralen Niere war eine auf 42 % der unbehandelten Kontrollgruppe gesenkte Renin-mRNA-Expression festzustellen. Auch hier wurde durch gleichzeitige Applikation des COX-2-Inhibitors keine Veränderung sichtbar. Erst durch Vorbehandlung mit SC-58236 für 5 Tage wurde die mRNA-Abundanz auf 28 % der unbehandelten Kontrollgruppe gesenkt (Abb. 27A).

Gleichermaßen wurde die PRA im Versuch reguliert. Durch die Stenose der linken Nierenarterie erhöhte sich die PRA von $5,4 \pm 0,7$ auf $21,5 \pm 1,2$ ng Ang-I \cdot h⁻¹ \cdot mL⁻¹. Diese Aktivität wurde durch zusätzliche Applikation von SC-58236 über den gleichen Zeitraum nicht beeinflusst, während eine 5-tägige Vorbehandlung mit dem COX-2-Inhibitor die PRA auf die Hälfte der Aktivität ($12,2 \pm 0,9$ ng Ang-I \cdot h⁻¹ \cdot mL⁻¹) der entsprechenden Placebogruppe senkte (Abb. 27B).

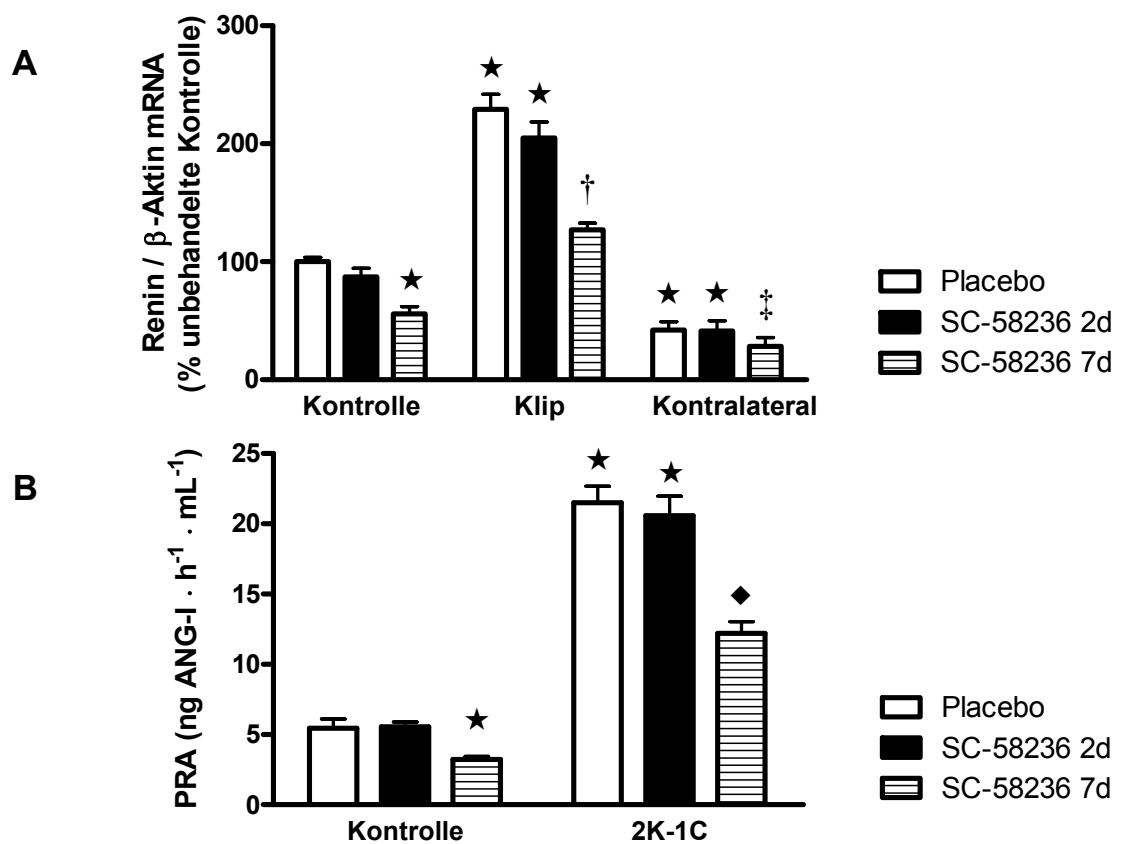


Abb. 27: Effekt der Applikation von $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ SC-58236 für zwei oder 7 Tage in Kombination mit einer zweitägigen linksseitigen Nierenarterienstenose (2K-1C) auf die Expression der Renin-mRNA im Nierencortex (A) und die Reninaktivität im Plasma (B). Gezeigt sind die Werte der geklippten und der kontralateralen Niere. Die Bestimmung der mRNA erfolgte mittels Realtime RT-PCR und wurde auf β -Aktin standardisiert, die Bestimmung der PRA erfolgte mittels RIA. Angegeben ist der MW \pm SEM von $n = 8$ Tieren. $\star p < 0,05$ vs. unbehandelte Kontrollgruppe. $\dagger p < 0,05$ vs. unbehandelte Klip-Gruppe $\ddagger p < 0,05$ vs. unbehandelte Kontralateral-Gruppe $\blacklozenge p < 0,05$ vs. SC-58236 7 d-Gruppe.

5.2.5.5 Beeinflussung des systolischen Blutdrucks und der Herzfrequenz

Im 2K-1C Modell erhöhte sich der systolische Blutdruck innerhalb von 48 Stunden auf 173 ± 8 mmHg. Durch Vorbehandlung mit SC-58236 konnte der systolische Blutdruck nur noch auf 149 ± 4 mmHg ansteigen. Gleichzeitige Applikation von SC-58236 für zwei Tage hatte keinen Einfluss auf die Erhöhung des Blutdrucks. Die Herzfrequenz wurde in keiner Versuchsgruppe signifikant beeinflusst (Tab. 10).

	sBP (mmHg)		HF (Schläge \cdot min ⁻¹)	
	Placebo	2K-1C	Placebo	2K-1C
Kontrolle	127 \pm 4	173 \pm 8 ★	391 \pm 13	405 \pm 10
SC-58236 2 d	131 \pm 4	169 \pm 5 ★	394 \pm 10	409 \pm 12
SC-58236 7 d	134 \pm 3	149 \pm 4 †	405 \pm 9	408 \pm 9

Tab. 10: Effekt der Applikation von $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ SC-58236 für zwei oder 7 Tage in Kombination mit einer zweitägigen linksseitigen Nierenarterienstenose (2K-1C) auf den systolischen Blutdruck (sBP) und die Herzfrequenz (HF). Die Bestimmung der Werte erfolgte an der Rattenschwanzarterie. Angegeben ist der MW \pm SEM von $n = 8$ Tieren. ★ $p < 0,05$ vs. unbehandelte Kontrollgruppe. † $p < 0,05$ vs. unbehandelte Klip-Gruppe.

5.2.6 Einfluss von SC-58236 auf die β_1 -Rezeptor-vermittelte Aktivierung des Renin-Systems

Es wurde der Effekt einer Applikation von SC-58236 ($10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$) über zwei bzw. 7 Tage auf die β -adrenerge Stimulation der Renin-mRNA-Expression und PRA durch eine 48-stündige Infusion von $160 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ Isoprenalin untersucht.

5.2.6.1 Beeinflussung der Expression der COX-1- und COX-2-mRNA im Nierencortex

Die Expression der COX-1-mRNA blieb in sämtlichen Versuchsgruppen im Vergleich zur Kontrollgruppe unbeeinflusst (Abb. 28A).

Die Genexpression der COX-2-mRNA wurde durch Applikation von SC-58236 allein nach zwei bzw. 7 Tagen um den Faktor 2,5 bzw. 2,7 erhöht. Die Infusion von Isoprenalin allein erhöhte die mRNA-Abundanz nicht. Zusätzliche Gabe von SC-58236 über zwei bzw. 7 Tage erhöhte die Expression der COX-2-mRNA um den Faktor 2,6 bzw. 2,1 (Abb. 28B).

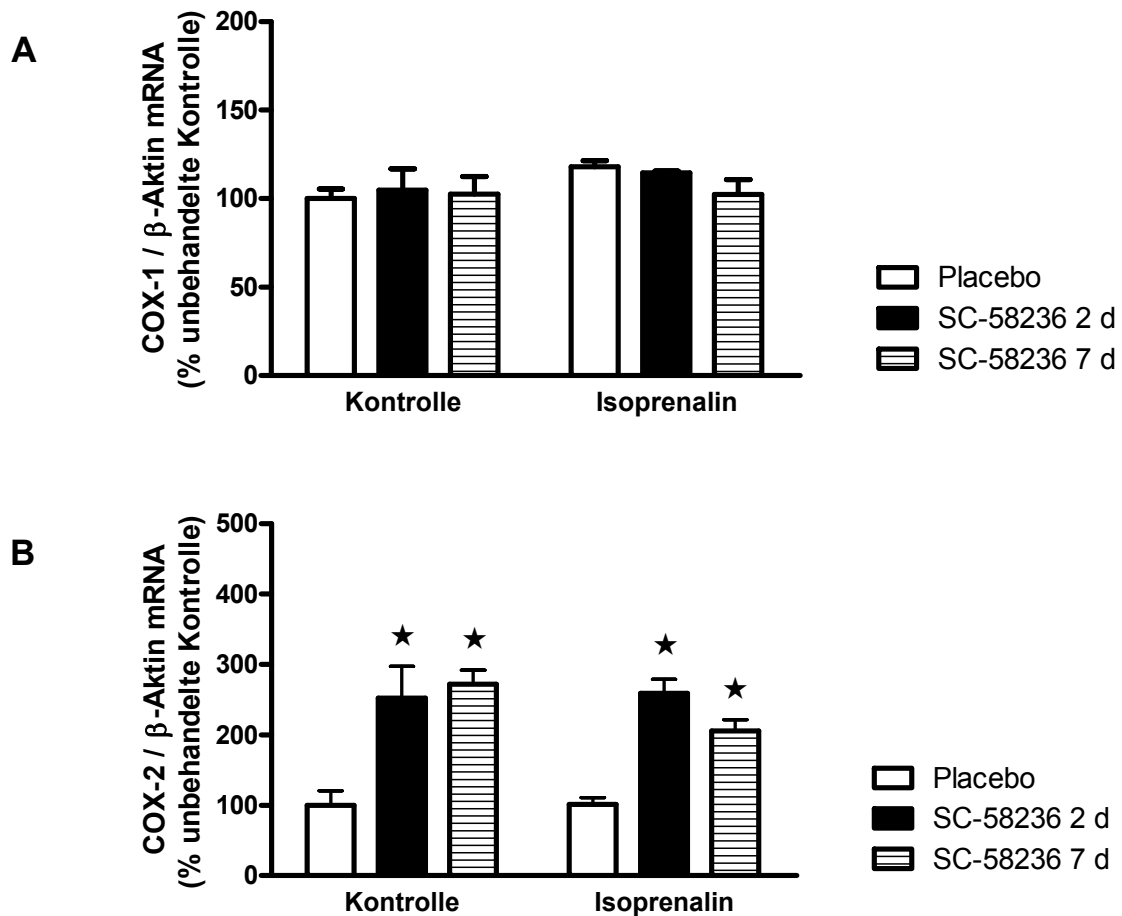


Abb. 28: Effekt der Applikation von $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ SC-58236 für zwei oder 7 Tage in Kombination mit einer zweitägigen Infusion von Isoprenalin ($160 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$) auf die Expression der COX-1-mRNA (A) und COX-2-mRNA (B) im Nierencortex. Die Bestimmung der mRNA erfolgte mittels Realtime RT-PCR und wurde auf β -Aktin standardisiert. Angegeben ist der MW \pm SEM von $n = 8$ Tieren. $\star p < 0,05$ vs. unbehandelte Kontrollgruppe.

5.2.6.2 Beeinflussung der Expression des COX-1- und COX-2-Proteins im Nierencortex

Zusätzlich zur mRNA-Expression wurde der Einfluss von SC-58236 auf die Proteinexpression der COX-1 und COX-2 bei zweitägiger Infusion von Isoprenalin im Western Blot untersucht. Zur Kontrolle der einheitlichen Auftragsmenge diente die Bestimmung von β -Aktin.

Die Expression des COX-1-Proteins zeigte im Western Blot zu den verschiedenen Zeitpunkten keine Unterschiede auf. Die Applikation von SC-58236 führte zu einem

deutlichen Anstieg des COX-2-Proteins. Isoprenalin allein erhöhte die Proteinexpression gegenüber der Kontrolle nicht. Durch Vorbehandlung mit SC-58236 wurden ansteigende Mengen COX-2-Protein detektiert (obere Bande, Abb. 29).

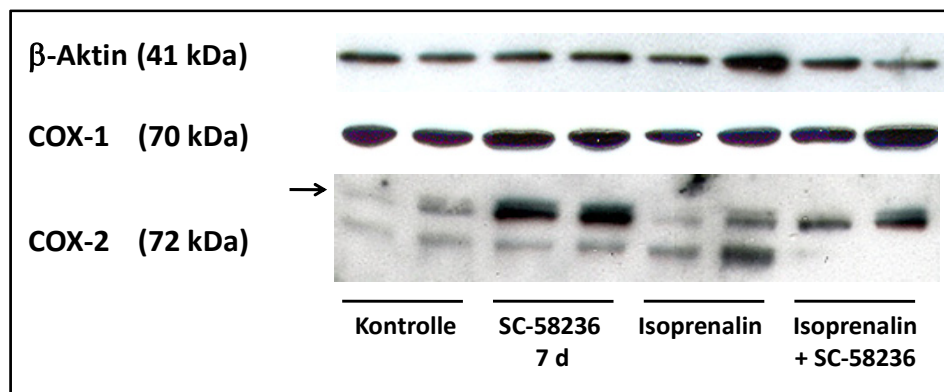


Abb. 29: Effekt der Applikation von $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ SC-58236 für 7 Tage bei Infusion von Isoprenalin ($160 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$) für 48 h auf die Proteinexpression von β -Aktin, COX-1 und COX-2 im Nierencortex. Zur Analyse wurden $100 \text{ } \mu\text{g}$ Gesamtproteinextrakt für die COX sowie $10 \text{ } \mu\text{g}$ Gesamtproteinextrakt für β -Aktin im Western Blot verwendet.

5.2.6.3 Beeinflussung der Konzentration von PGE_2 im Nierencortex

Die Infusion von Isoprenalin über 48 h veränderte die Konzentration an PGE_2 im Nierencortex nicht. Es wurde eine Konzentration von $3,1 \pm 0,2 \text{ ng PGE}_2$ pro mg Protein für die Isoprenalin-Gruppe gemessen. Gleichzeitige Applikation von SC-58236 verminderte die PGE_2 -Konzentration genauso stark ($1,6 \pm 0,2 \text{ ng pro mg Protein}$) wie die zusätzliche Vorinkubation mit SC-58236 über 5 Tage ($1,7 \pm 0,1 \text{ ng PGE}_2$ pro mg Protein, Abb. 30).

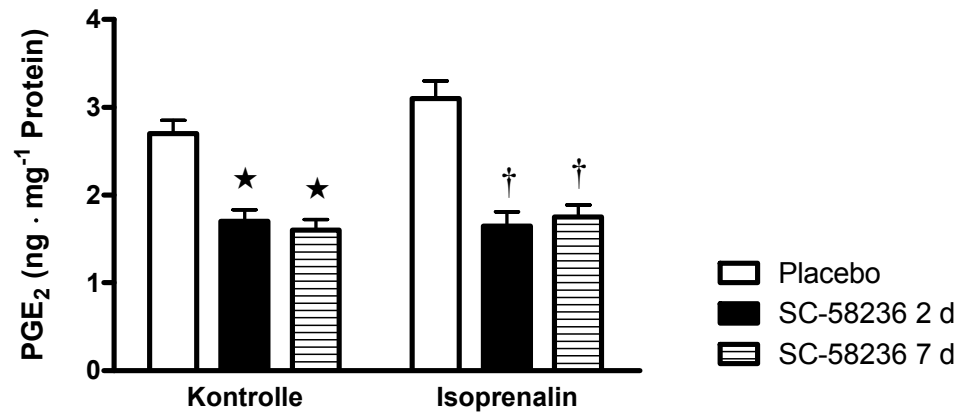


Abb. 30: Effekt der Applikation von $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ SC-58236 für zwei oder 7 Tage in Kombination mit einer zweitägigen Infusion von Isoprenalin ($160 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$) auf die Bildung von PGE_2 im Nierencortex. Die Bestimmung der PGE_2 -Konzentration erfolgte mittels ELISA. Angegeben ist der MW \pm SEM von $n = 8$ Tieren. $\star p < 0,05$ vs. unbehandelte Kontrollgruppe. $\dagger p < 0,05$ vs. Isoprenalin allein.

5.2.6.4 Beeinflussung der Reninexpression und -freisetzung

Die alleinige Gabe von Isoprenalin steigerte die Expression der Renin-mRNA gegenüber der unbehandelten Kontrolle auf 300 %, gleichzeitige Applikation von SC-58236 beeinflusste die mRNA-Abundanz nicht. Bei 5-tägiger Vorbehandlung mit SC-58236 wurde die Expression der Renin-mRNA jedoch auf 195 % vermindert. Dies entspricht einer Senkung um 35 % gegenüber der nur mit Isoprenalin behandelten Gruppe (Abb. 31A).

SC-58236 beeinflusste die PRA nach zwei Tagen nicht, bei 7-tägiger Applikation sank diese von $5,4 \pm 0,6$ auf $3,2 \pm 0,5 \text{ ng Ang-I} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{mL}^{-1}$. Die PRA wurde durch die Infusion von Isoprenalin auf $19,4 \pm 1,3 \text{ ng Ang-I} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{mL}^{-1}$ gesteigert. Auch hier wurde durch gleichzeitige Applikation von SC-58236 der Anstieg der PRA nicht beeinflusst. Wurden die Tiere jedoch zusätzlich 5 Tage mit SC-58236 vorbehandelt, war ein signifikanter Abfall der PRA auf $13,2 \pm 1,1 \text{ ng Ang-I} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{mL}^{-1}$ die Folge (Abb. 31B).

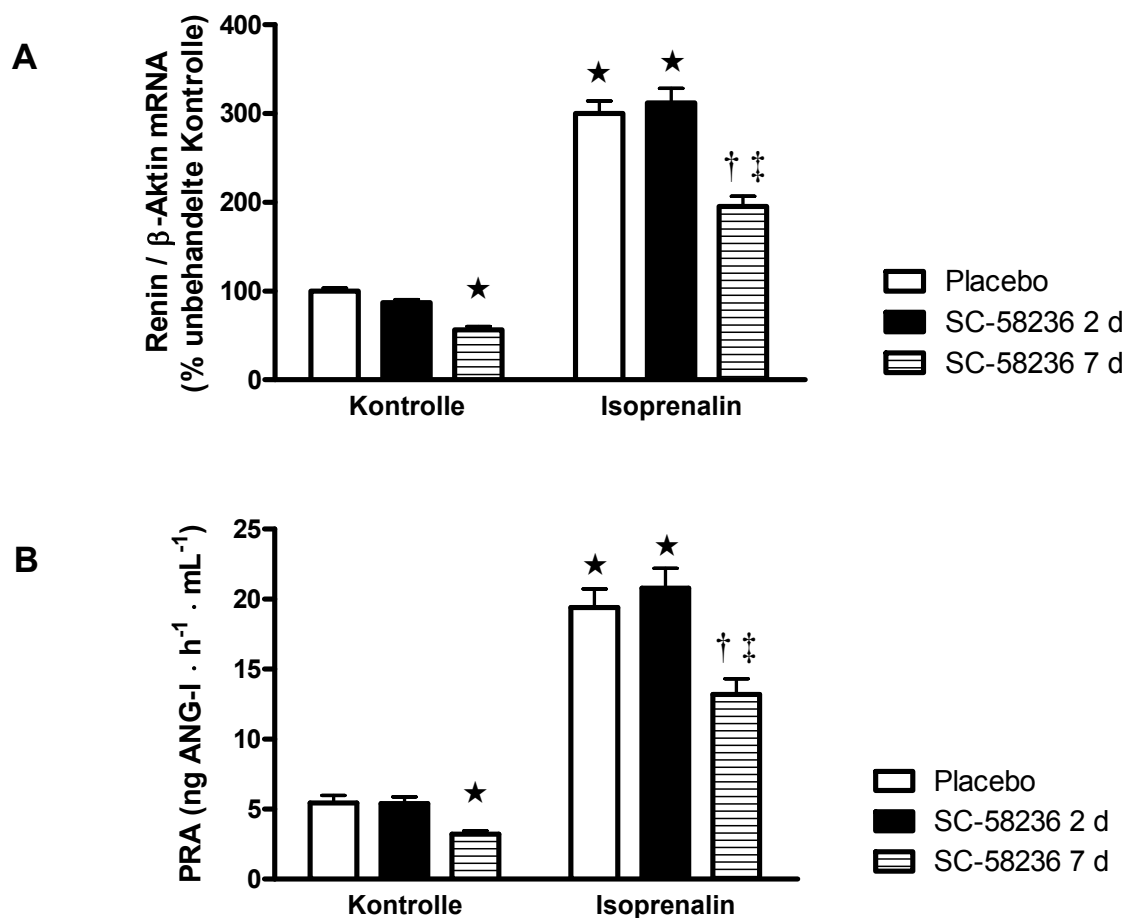


Abb. 31: Effekt der Applikation von $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ SC-58236 für zwei oder 7 Tage in Kombination mit einer zweitägigen Infusion von Isoprenalin ($160 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$) auf die Expression der Renin-mRNA im Nierencortex (A) und die Reninaktivität im Plasma (B). Die Bestimmung der mRNA erfolgte mittels Realtime RT-PCR und wurde auf β -Aktin standardisiert, die Bestimmung der PRA erfolgte mittels RIA. Angegeben ist der MW \pm SEM von $n = 8$ Tieren. * $p < 0,05$ vs. unbehandelte Kontrollgruppe. † $p < 0,05$ vs. Isoprenalin allein. ‡ $p < 0,05$ vs. SC-58236 7 d.

5.2.6.5 Beeinflussung des systolischen Blutdrucks und der Herzfrequenz

Der systolische Blutdruck wurde in den mit Isoprenalin behandelten Versuchsgruppen im Vergleich zur Kontrollgruppe nicht beeinflusst, gleichzeitig kam es jedoch zu einem starken Anstieg der Herzfrequenz auf ca. 540 Schläge pro Minute. Durch die Applikation von SC-58236 wurden in keiner Versuchsgruppe die beiden Parameter verändert (Tab. 11).

	sBP (mmHg)		HF (Schläge · min ⁻¹)	
	Placebo	Isoprenalin	Placebo	Isoprenalin
Kontrolle	130 ± 2	125 ± 5	400 ± 8	540 ± 12 ★
SC-58236 2 d	137 ± 3	130 ± 5	400 ± 4	540 ± 8 ★
SC-58236 7 d	132 ± 5	126 ± 4	397 ± 10	531 ± 32 ★

Tab. 11: Effekt der Applikation von $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ SC-58236 für zwei oder 7 Tage in Kombination mit einer zweitägigen Infusion von Isoprenalin ($160 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$) auf den systolischen Blutdruck (sBP) und die Herzfrequenz (HF). Die Bestimmung der Werte erfolgte an der Rattenschwanzarterie. Angegeben ist der MW ± SEM von n = 8 Tieren. ★p < 0,05 vs. unbehandelte Kontrollgruppe.

5.3 Einfluss von SC-58236 auf die Aktivierung des Renin-Systems durch Hydralazin

5.3.1 Zeitabhängiger Effekt von Hydralazin auf das Renin-System

Hydralazin ist ein potenter Vasodilatator. Es wird angenommen, dass er über den Barorezeptor-Signalweg eine Stimulation des Renin-Systems vermittelt. Es wurde der zeitabhängige Effekt von Hydralazin auf den systolischen Blutdruck, die Herzfrequenz und das Renin-System untersucht. Da diese Effekte PGE₂-vermittelt sein könnten, wurde auch die COX-1- und COX-2-mRNA-Expression sowie die PGE₂-Freisetzung im Nierencortex untersucht.

5.3.1.1 Beeinflussung des systolischen Blutdrucks und der Herzfrequenz

Der systolische Blutdruck wurde durch die Applikation von Hydralazin innerhalb von 24 h auf ein Minimum von 97 ± 1 mmHg gesenkt. Durch weitere Hydralazingabe stieg der Blutdruck langsam auf 115 ± 2 mmHg an (Abb. 32A).

Gegenreflektorisch wurde die Herzfrequenz innerhalb von 24 h von 390 ± 5 auf 458 ± 6 Schläge \cdot min⁻¹ gesteigert. Mit steigendem Blutdruck sank die Herzfrequenz auf 418 ± 3 Schläge \cdot min⁻¹ nach 5-tägiger Applikation von Hydralazin (Abb. 32B).

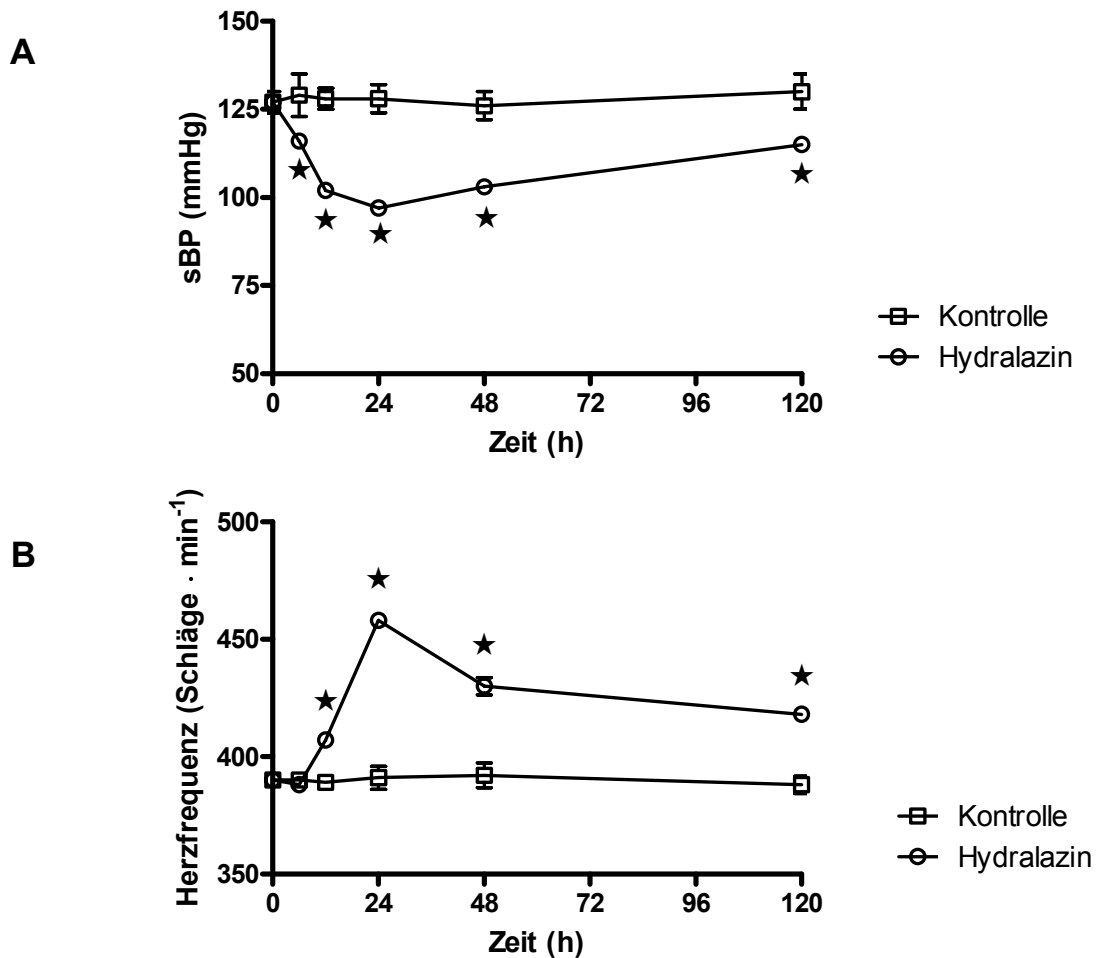


Abb. 32: Zeitabhängiger Effekt der Applikation von Hydralazin ($30 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$) auf den systolischen Blutdruck (sBP, A) sowie die Herzfrequenz (HF, B) nach 6, 12, 24, 48 und 120 Stunden. Angegeben ist der MW \pm SEM von $n = 6$ Tieren. * $p < 0,05$ vs. Kontrolle.

5.3.1.2 Expression der COX-1- und COX-2-mRNA im Nierencortex

Durch die Applikation von Hydralazin wurde die Expression der COX-1-mRNA im Nierencortex nicht beeinflusst (Abb. 33A).

Die Expression der COX-2-mRNA erreichte nach 12 h erhöhte Werte von 213 % des Kontrollwertes, durch weitere Behandlung mit Hydralazin blieb die Expressionsrate erhalten (Abb. 33B).

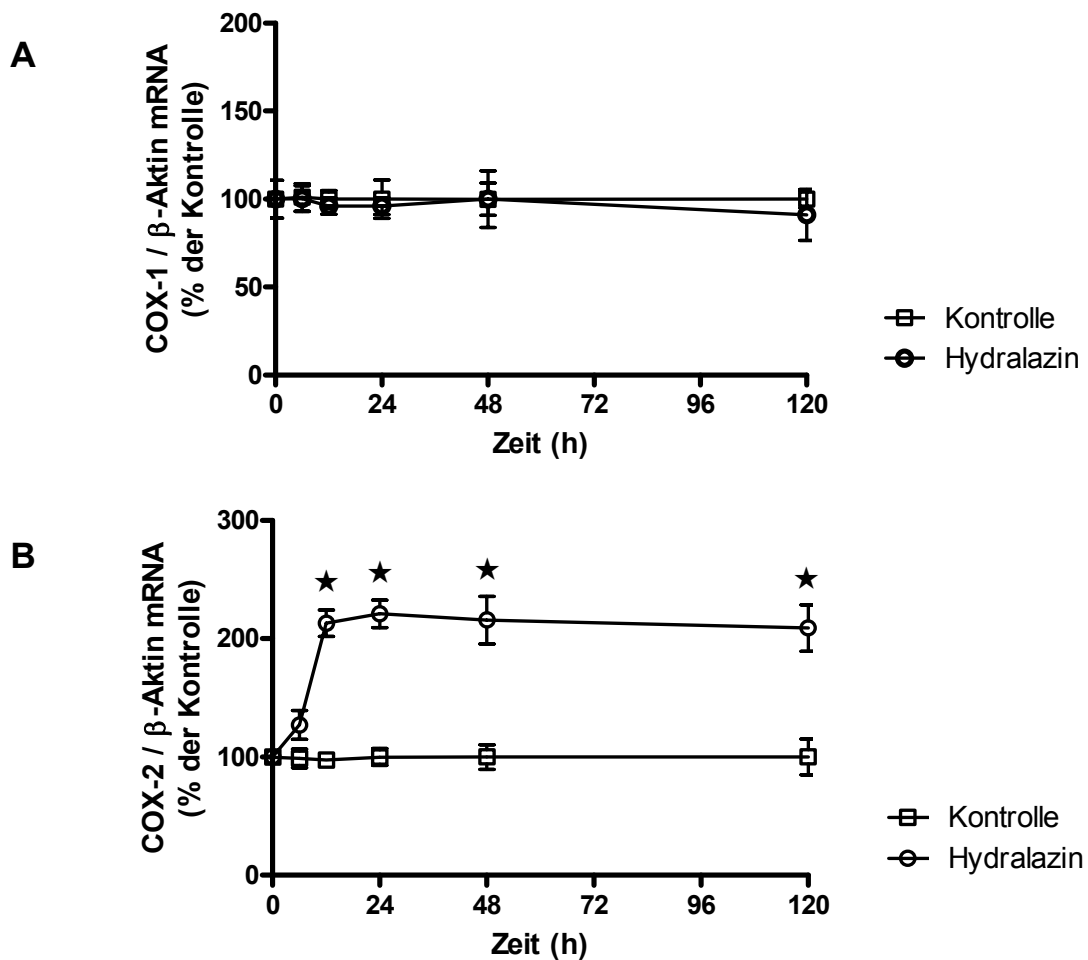


Abb. 33: Zeitabhängiger Effekt der Applikation von $30 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ Hydralazin auf die Expression der COX-1-mRNA (A) und der COX-2-mRNA (B) im Nierencortex nach 6, 12, 24, 48 und 120 Stunden. Die Bestimmung der mRNA erfolgte mittels Realtime RT-PCR und wurde auf β -Aktin standardisiert. Angegeben ist der MW \pm SEM von $n = 6$ Tieren. $\star p < 0,05$ vs. Kontrolle.

5.3.1.3 Expression des COX-1- und COX-2-Proteins im Nierencortex

Zusätzlich zur mRNA-Expression wurde der Einfluss von Hydralazin auf die Proteinexpression der COX-1 und COX-2 im Western Blot untersucht. Zur Kontrolle der einheitlichen Auftragsmenge diente die Bestimmung von β -Aktin.

Die Expression des COX-1-Proteins zeigte im Western Blot zu den verschiedenen Zeitpunkten keine Unterschiede. Die Applikation von Hydralazin führte bereits nach

einem Tag zu einem Anstieg des COX-2-Proteins, wobei nach 5 Tagen ein Maximum erreicht wurde (Abb. 34).

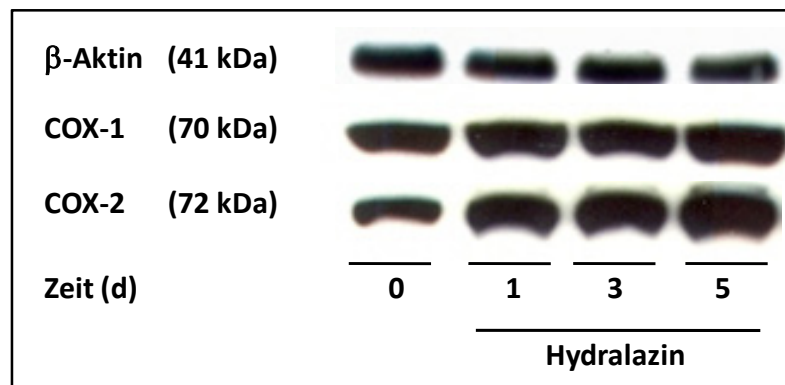


Abb. 34: Zeitabhängiger Effekt der Applikation von $30 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ Hydralazin auf die Proteinexpression von β -Aktin, COX-1 und COX-2 nach 1, 3 und 5 Tagen im Nierencortex. Zur Analyse wurden $100 \mu\text{g}$ Gesamtproteinextrakt für die COX sowie $10 \mu\text{g}$ Gesamtproteinextrakt für β -Aktin im Western Blot verwendet.

5.3.1.4 Konzentration von PGE_2 im Nierencortex

Die Behandlung mit Hydralazin über einen Zeitraum von 6 bis 120 h erhöhte die Gewebekonzentration von PGE_2 im Nierencortex nach 24 h, ausgehend von $2,4 \pm 0,3 \text{ ng}$ pro mg Protein um den Faktor 1,6 und erreichte nach 120 h ein Maximum von $4,4 \pm 0,5 \text{ ng}$ PGE_2 pro mg Protein (Abb. 35).

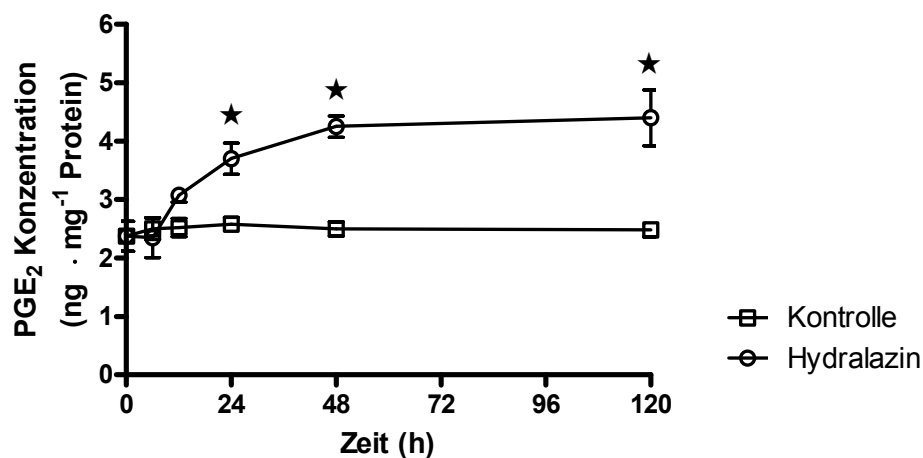


Abb. 35: Zeitabhängiger Effekt der Applikation von $30 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ Hydralazin auf die Bildung von PGE_2 im Nierencortex nach 6, 12, 24, 48 und 120 Stunden. Die Bestimmung der PGE_2 -Konzentration erfolgte mittels ELISA. Angegeben ist der $\text{MW} \pm \text{SEM}$ von $n = 6$ Tieren. $\star p < 0,05$ vs. Kontrolle.

5.3.1.5 Beeinflussung der Reninexpression und -freisetzung

Durch Behandlung mit Hydralazin wurde die Renin-mRNA-Expression nach 24 h auf 212 % gegenüber der Kontrollgruppe erhöht. Dieses Expressionsniveau blieb bis zum fünften Tag bestehen und wurde nur leicht auf 228 % erhöht (Abb. 36A).

Die PRA stieg bereits 12 h nach Applikation von Hydralazin signifikant von $3,8 \pm 0,3$ auf $9,1 \pm 0,8 \text{ ng Ang-I} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{mL}^{-1}$ und erreichte nach 5 Tagen ein Maximum von $17,8 \pm 1,2 \text{ ng Ang-I} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{mL}^{-1}$ (Abb. 36B).

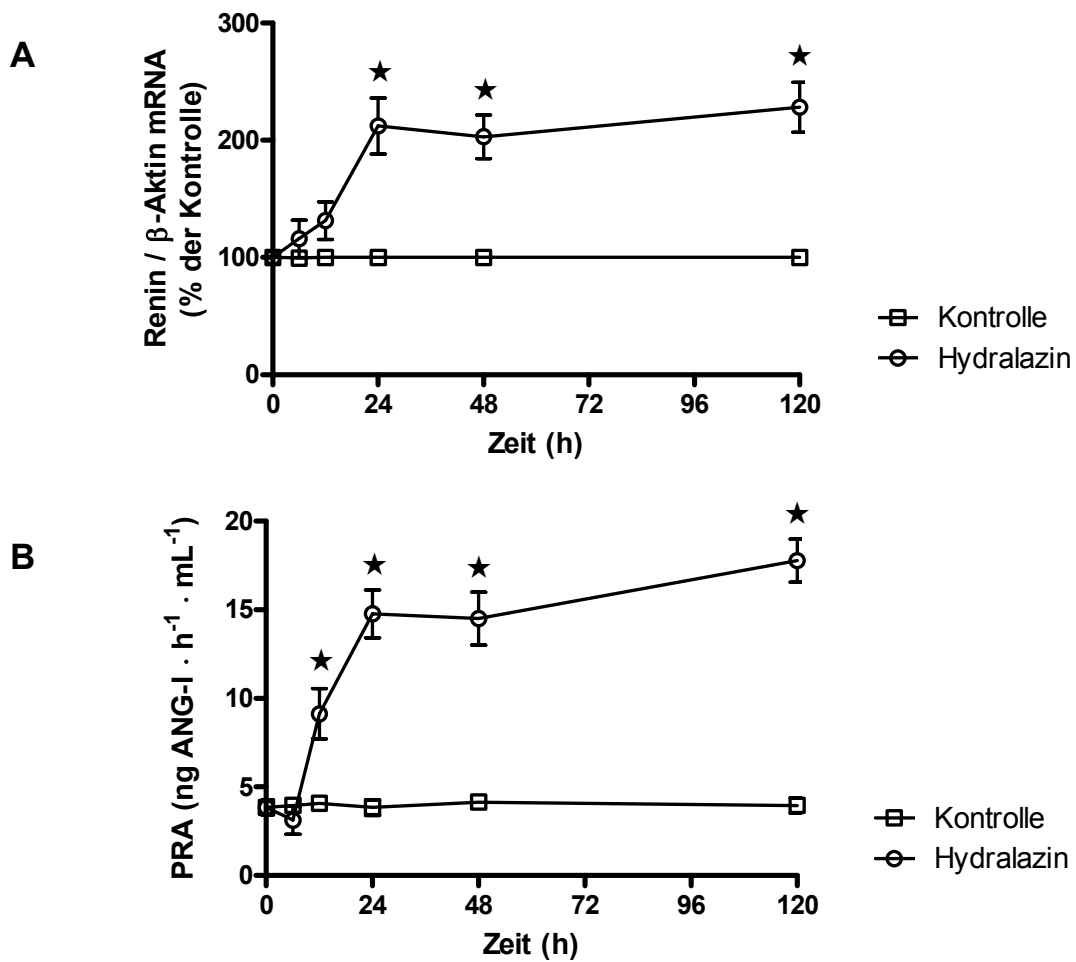


Abb. 36: Zeitabhängiger Effekt von $30 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ Hydralazin auf die Expression der Renin-mRNA im Nierencortex (A) und die Reninaktivität im Plasma (B) nach 6, 12, 24, 48 und 120 Stunden. Die Bestimmung der mRNA erfolgte mittels Realtime RT-PCR und wurde auf β -Aktin standardisiert, die Bestimmung der PRA erfolgte mittels RIA. Angegeben ist der MW \pm SEM von $n = 6$ Tieren. $\star p < 0,05$ vs. Kontrolle.

5.3.2 Zeitabhängiger Effekt von SC-58236 auf die Reninregulation durch Hydralazin

Da Hydralazin die COX-2-Expression und die PGE₂-Konzentration im Nierencortex sowie die Renin-mRNA-Abundanz und die PRA beeinflusst, wurde zeitabhängig der Effekt des COX-2-Inhibitors SC-58236 bei täglicher Applikation von 10 mg · kg⁻¹ · d⁻¹ auf die Regulationen des Blutdrucks, der Cyclooxygenasen, PGE₂ sowie des Renin-Systems durch Hydralazin (30 mg · kg⁻¹ · d⁻¹) untersucht.

5.3.2.1 Beeinflussung des systolischen Blutdrucks und der Herzfrequenz

SC-58236 verminderte den Abfall des systolischen Blutdrucks nach eintägiger Gabe in Kombination mit Hydralazin, so dass nur noch eine Absenkung um 10 mmHg gegenüber der Kontrolle festgestellt werden konnte. Eine 5-tägige Applikation von SC-58236 ließ den Blutdruck sogar über die Kontrollwerte hinweg auf 141 ± 2 mmHg ansteigen (Abb. 37A). Die Herzfrequenz wurde jedoch durch die zusätzliche Gabe von SC-58236 nicht beeinflusst (Abb. 37B).

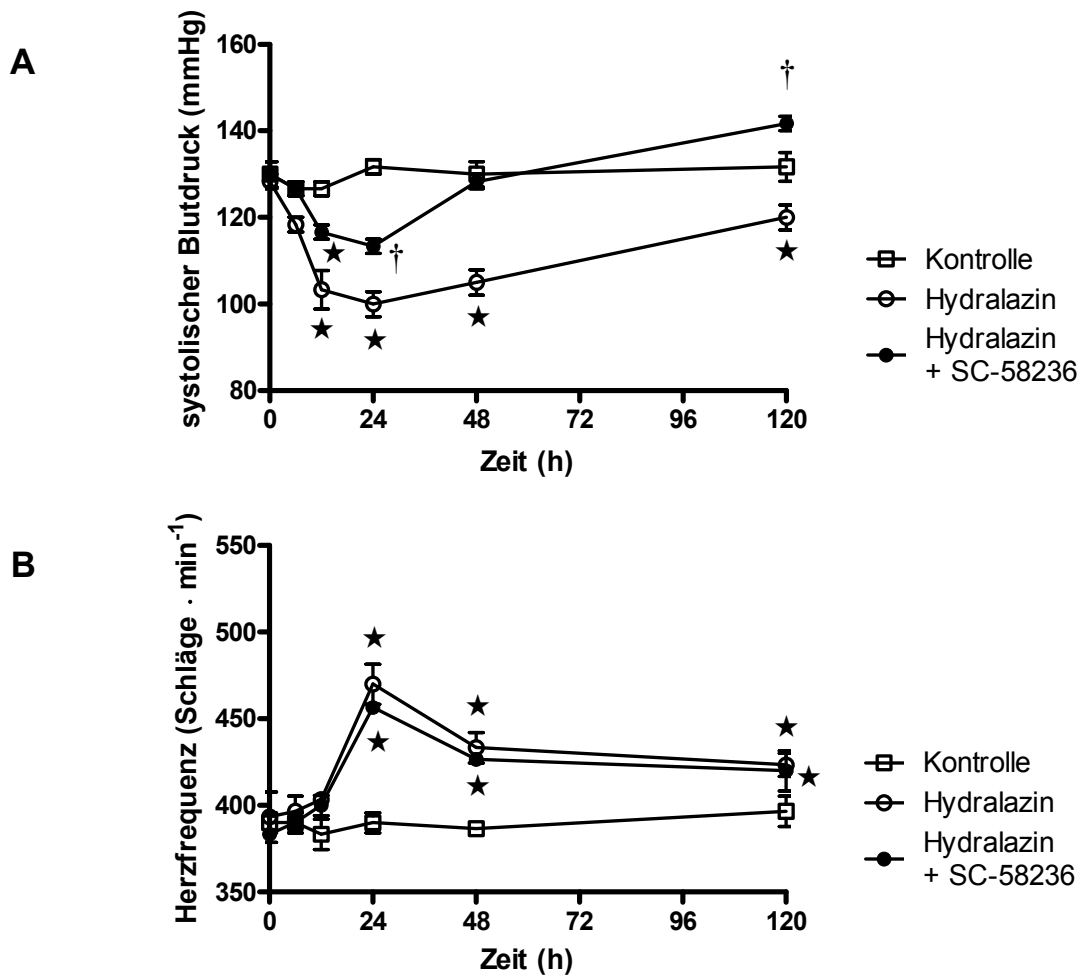


Abb. 37: Zeitabhängiger Effekt von SC-58236 ($10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$) in Kombination mit Hydralazin ($30 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$) auf den systolischen Blutdruck (sBP, A) sowie die Herzfrequenz (HF, B) nach 6, 12, 24, 48 und 120 Stunden. Angegeben ist der $MW \pm SEM$ von $n = 4$ Tieren. $\star p < 0,05$ vs. Kontrolle. $\dagger p < 0,05$ vs. Hydralazin allein.

Da bereits nach 24 h ein signifikanter Anstieg des systolischen Blutdrucks erkennbar war, wurde zusätzlich zur Untersuchung der Effekte der Kombinationstherapie SC-58236 mit Hydralazin für 5 Tage auch der Effekt auf die COX- und Reninregulation nach einem Tag untersucht.

5.3.2.2 Beeinflussung der Expression der COX-1- und COX-2-mRNA im Nierencortex

Durch die zusätzliche Applikation von SC-58236 wurde die Expression der COX-1-mRNA in keiner Untersuchungsgruppe beeinflusst (Abb. 38A).

Die Expression der COX-2-mRNA wurde durch die alleinige Gabe von Hydralazin verdoppelt. Gleichzeitige eintägige Applikation von SC-58236 veränderte die Expressionsrate nicht, während bei 5-tägiger Gabe ein Anstieg der COX-2-mRNA um den Faktor 5,7 gegenüber der unbehandelten Kontrollgruppe erzielt wurde (Abb. 38B).

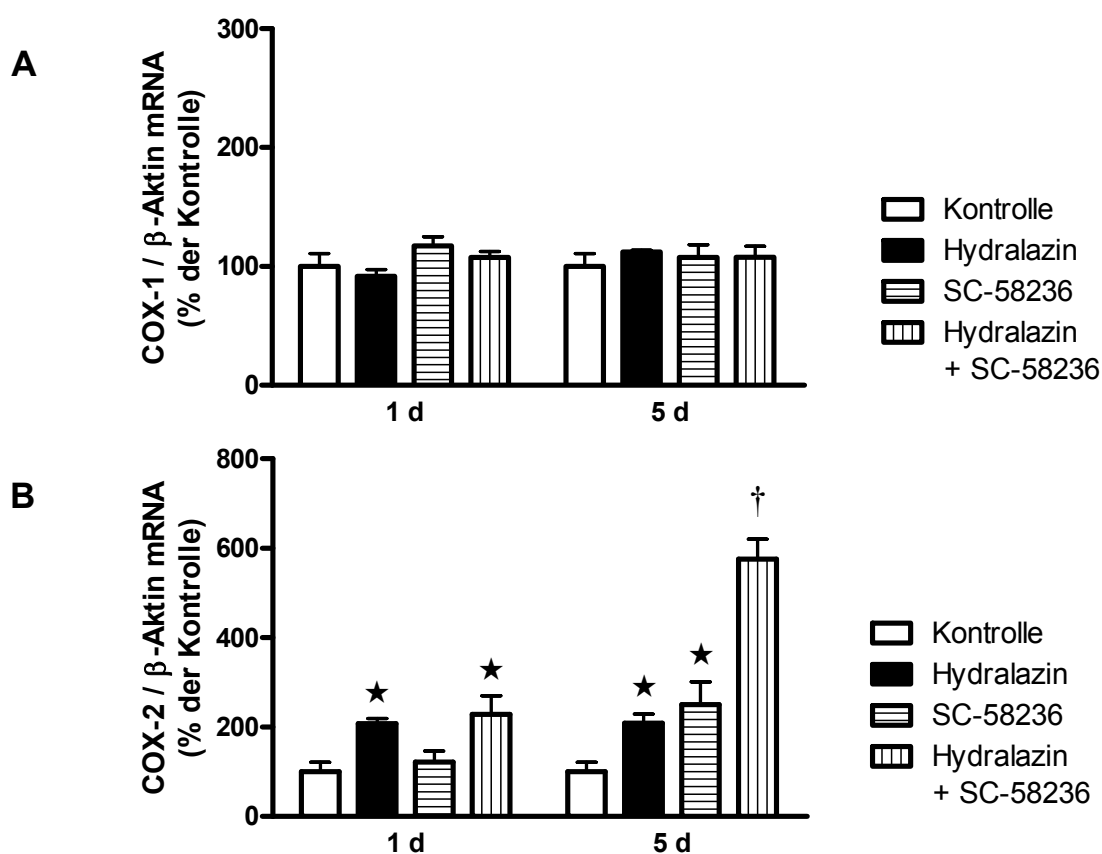


Abb. 38: Effekt der Applikation von $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ SC-58236 für ein oder 5 Tage in Kombination mit gleichzeitiger Gabe von $30 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ Hydralazin auf die Expression der COX-1-mRNA (A) und die COX-2-mRNA (B) im Nierencortex. Die Bestimmung der mRNA erfolgte mittels Realtime RT-PCR und wurde auf β -Aktin standardisiert. Angegeben ist der $\text{MW} \pm \text{SEM}$ von $n = 4$ Tieren. $\star p < 0,05$ vs. unbehandelte Kontrollgruppe. $\dagger p < 0,05$ vs. Hydralazin allein.

5.3.2.3 Beeinflussung der Konzentration von PGE₂ im Nierencortex

Durch die kombinierte Applikation von Hydralazin und SC-58236 über einen Tag wurde die PGE₂-Konzentration im Nierencortex von $3,8 \pm 0,4$ ng pro mg Protein bei alleiniger Hydralazin-Gabe auf $1,8 \pm 0,4$ ng pro mg Protein gesenkt. Auch bei 5-tägiger Applikation erfolgte eine Senkung der PGE₂-Konzentration auf das gleiche Niveau (Abb. 39).

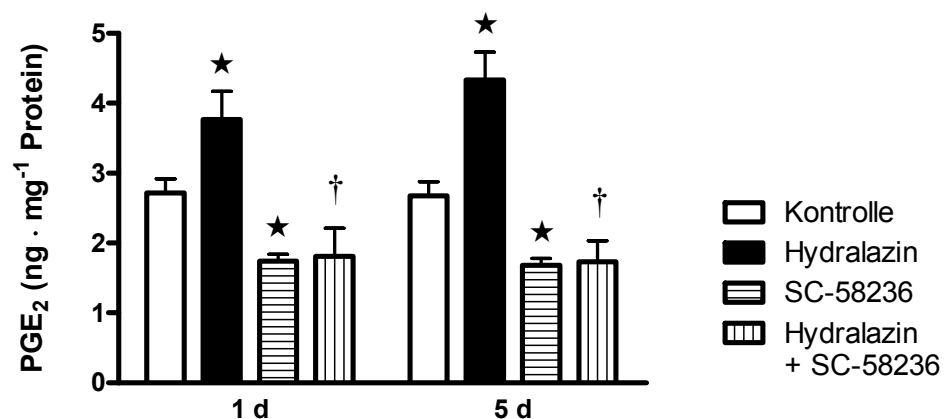


Abb. 39: Effekt der Applikation von $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ SC-58236 für ein oder 5 Tage in Kombination mit gleichzeitiger Gabe von $30 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ Hydralazin auf die Bildung von PGE₂ im Nierencortex. Die Bestimmung der PGE₂-Konzentration erfolgte mittels ELISA. Angegeben ist der MW \pm SEM von $n = 4$ Tieren. * $p < 0,05$ vs. Kontrolle. † $p < 0,05$ vs. Hydralazin allein.

5.3.2.4 Beeinflussung der Reninexpression und -freisetzung

Die Expression der Renin-mRNA wurde durch Applikation von Hydralazin allein um den Faktor 2,1 im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle erhöht. Gleichzeitige Gabe von SC-58236 änderte die mRNA-Expression nach einem Tag nicht signifikant. Erst nach 5 Tagen erfolgte eine Senkung der Renin-mRNA-Expression auf 64 % des Wertes der mit Hydralazin allein behandelten Versuchsgruppe (Abb. 40A).

Die PRA wurde durch alleinige Applikation von Hydralazin für einen Tag um den Faktor 5,6 von $4,7 \pm 0,3$ auf $26,5 \pm 1,9 \text{ ng Ang-I} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{mL}^{-1}$ erhöht. Diese Aktivität wurde durch zusätzliche Applikation von SC-58236 nach einem Tag bereits auf

$19,5 \pm 1,6 \text{ ng Ang-I} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{mL}^{-1}$ gesenkt. Nach 5-tägiger Applikation des COX-2-Inhibitors zusätzlich zur Hydralazin-Gabe konnte eine signifikante Absenkung der PRA von $29,7 \pm 1,3$ auf $15,8 \pm 0,8 \text{ ng Ang-I} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{mL}^{-1}$ festgestellt werden (Abb. 40B).

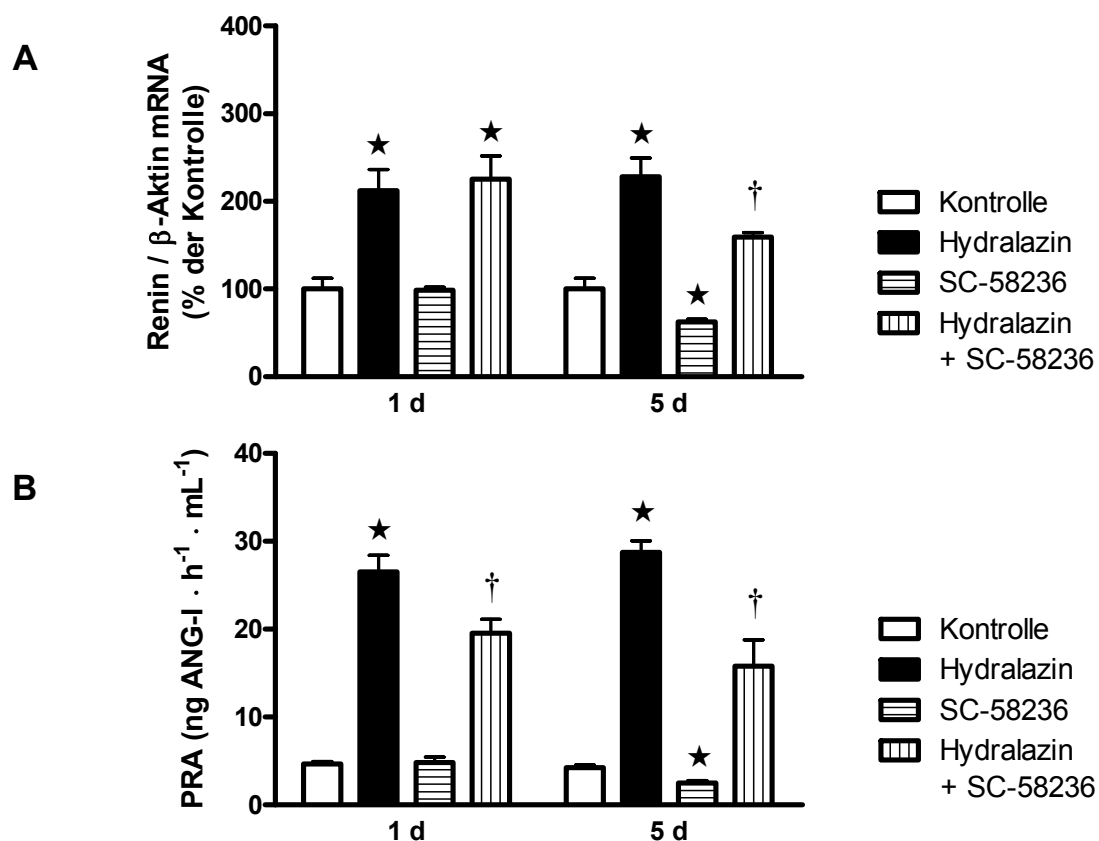


Abb. 40: Effekt der Applikation von $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ SC-58236 für ein oder 5 Tage in Kombination mit gleichzeitiger Gabe von $30 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ Hydralazin auf die Expression der Renin-mRNA im Nierencortex (A) und Reninaktivität im Plasma (B). Die Bestimmung der mRNA erfolgte mittels Realtime RT-PCR und wurde auf β -Aktin standardisiert, die Bestimmung der PRA erfolgte mittels RIA. Angegeben ist der MW \pm SEM von $n = 4$ Tieren. $\star p < 0,05$ vs. unbehandelte Kontrollgruppe. $\dagger p < 0,05$ vs. jeweilige Hydralazin-Gruppe.

5.3.3 Zeitabhängiger Einfluss von SC-58236 auf die Effekte einer akuten Applikation von Hydralazin

5.3.3.1 Effekt von SC-58236 auf den mittleren arteriellen Druck

Da sich der systolische Blutdruck in der mit Hydralazin allein behandelten Gruppe deutlich von dem in der zusätzlich mit Hydralazin behandelten Gruppe unterschied, wurde der Effekt von SC-58236 ($10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$) auf den mittleren arteriellen Druck (MAD) in Kombination mit Hydralazin ($30 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$, i. v.) untersucht.

Zunächst wurde der Effekt von Hydralazin innerhalb der ersten halben Stunde der Applikation allein und nach einer zweistündigen Vorbehandlung mit i. p. appliziertem SC-58236 auf den MAD und die Differenz des MAD zur Kontrolle untersucht (ΔMAD). Anschließend wurde der gleiche Effekt nach 5-tägiger Vorbehandlung mit SC-58236 über eine Schlundsonde untersucht.

Bei der Applikation von Hydralazin sank der MAD von 103 ± 7 auf 62 ± 7 mmHg. Durch zweistündige Vorbehandlung mit SC-58236 sank der MAD von 107 ± 7 ebenso auf 62 ± 7 mmHg (Abb. 41A). Bei 5-tägiger Vorbehandlung wurde der MAD, ausgehend von einem leicht erhöhten MAD, um etwa den gleichen Wert gesenkt ($\Delta\text{MAD} = -45 \pm 3$) wie durch Hydralazin allein ($\Delta\text{MAD} = -41 \pm 4$, Abb. 41B).

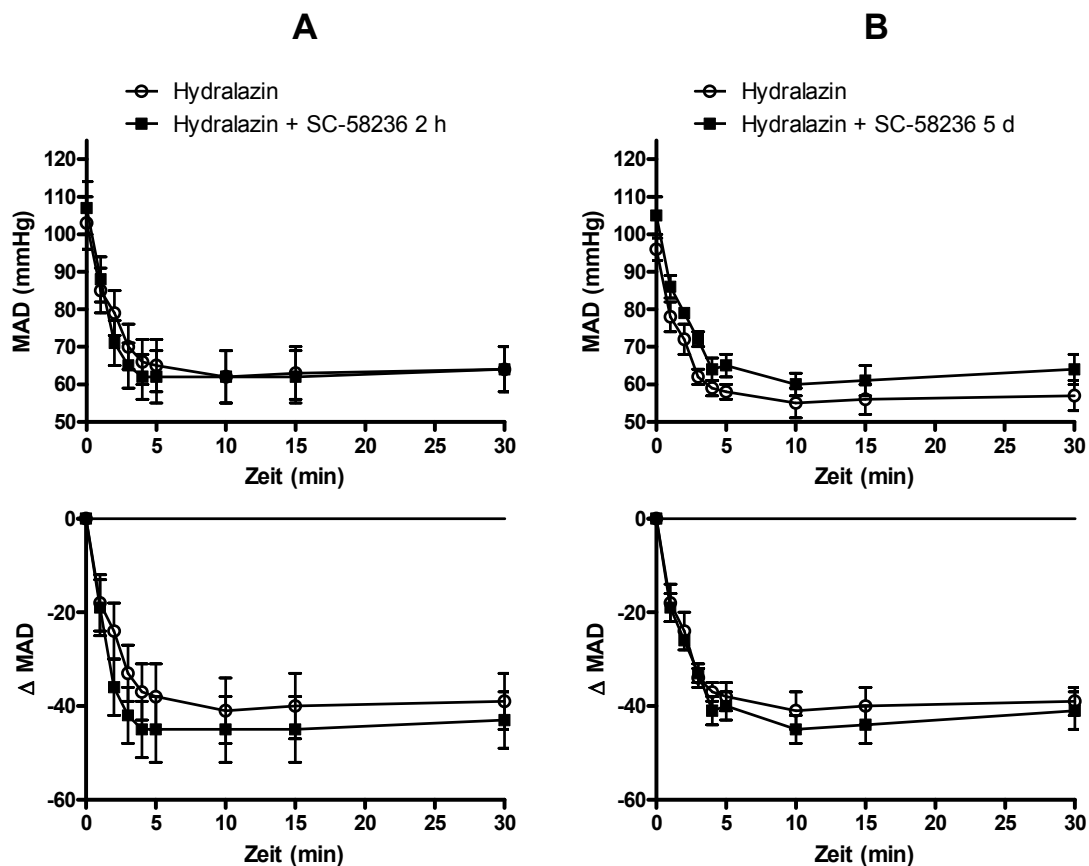


Abb. 41: Zeitabhängiger Effekt von SC-58236 ($10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$) auf die Blutdrucksenkung durch Hydralazin ($30 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$, i. v.). Es wurde eine Stunde oder 5 Tage vor der Hydralazin-Applikation mit SC-58236 vorbehandelt. Angegeben sind der mittlere arterielle Druck (MAD) sowie die Differenz zwischen der Kontrolle und dem jeweiligen untersuchten Zeitpunkt (Δ MAD). Angegeben ist der MW \pm SEM von $n = 4$ Tieren.

5.3.3.2 Effekt von SC-58236 auf die Plasmareninaktivität

Es wurde der Effekt von SC-58236 auf die Erhöhung der PRA durch Blutdrucksenkung mittels Hydralazin nach 30 Minuten untersucht. Die i. p.-Applikation von SC-58236 für 150 Minuten senkte die PRA leicht von $6,9 \pm 1,7$ auf $4,7 \pm 1,3 \text{ ng Ang-I} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{mL}^{-1}$, die orale Gabe des COX-2-Inhibitors für 5 Tage auf $3,2 \pm 1,2 \text{ ng Ang-I} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{mL}^{-1}$. Die Gabe von Hydralazin erhöhte die PRA innerhalb von 30 Minuten auf $61,0 \pm 8,1 \text{ ng Ang-I} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{mL}^{-1}$. Dieser Wert wurde durch die Kurzzeitgabe von SC-58236 auf

48,7 ± 3,7 bzw. durch die 5-tägige Vorbehandlung auf 39,2 ± 2,1 ng Ang-I · h⁻¹ · mL⁻¹ gesenkt (Abb. 42).

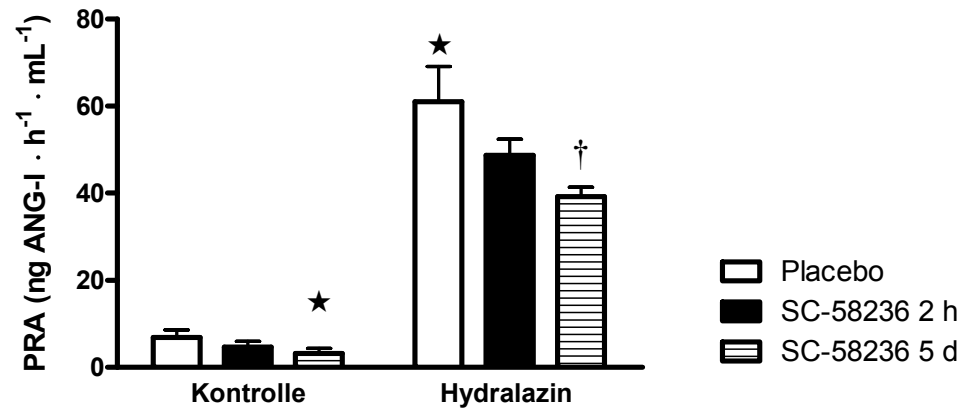


Abb. 42: Effekt der Vorbehandlung mit SC-58236 ($10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$) für zwei Stunden (i. p.) oder 5 Tage (oral) in Kombination mit einer Applikation von $30 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ Hydralazin i. v. für 30 Minuten auf die Reninaktivität im Plasma. Die Bestimmung der PRA erfolgte mittels RIA. Angegeben ist der MW ± SEM von $n = 4$ Tieren. * $p < 0,05$ vs. unbehandelte Kontrollgruppe. † $p < 0,05$ vs. Hydralazin allein.

5.4 Zusammenfassung der relativen Veränderungen der Renin-mRNA-Expression und der PRA

Aufgrund der basalen Senkung der Renin-mRNA-Abundanz und der PRA durch den COX-2-Inhibitor SC-58236 sind die relativen Veränderungen beider Parameter im Verhältnis zur unbehandelten Kontrolle bzw. zur mit SC-58236 behandelten Gruppe interessant. Da SC-58236 nach einem bzw. zwei Tagen die Renin-mRNA-Expression bzw. die PRA nicht veränderte, sind diese Werte hier nicht dargestellt.

Bei 7-tägiger Behandlung mit SC-58236 in der Kombination mit einer Hochsalzdiät bzw. einer Niedrigsalzdiät für jeweils eine Woche, mit der linksarteriellen Nierenstenose und der Isoprenalingabe für jeweils 48h sowie mit der Applikation von Captopril, Ramipril und Candesartan für 7 Tage ergeben sich relative Anstiege der Renin-mRNA gegenüber der SC-58236-Kontrollgruppe um die Faktoren 0,5, 2,3, 2,3, 3,5, 1,9, 4,9 und 5,7. Diese relativen Anstiege unterscheiden sich nicht von denen zwischen den nicht zusätzlich mit SC-58236 behandelten Tieren und der unbehandelten Kontrollgruppe. Eine 5-tägige kombinierte Applikation von Hydralazin und SC-58236 führte zu einem relativen Anstieg der Renin-mRNA um den Faktor 2,5 gegenüber der SC-58236-Kontrollgruppe (Abb. 43A).

Bei der PRA ergeben sich relative Anstiege um die Faktoren 0,6, 2,5, 3,8, 4,1, 4,6, 8,2 und 8,5 zwischen den oben aufgeführten Modulatoren in Kombination mit SC-58236 und der SC-58236-Kontrollgruppe. Diese unterscheiden sich wiederum nicht von denen zwischen den nicht zusätzlich mit SC-58236 behandelten Tieren und der unbehandelten Kontrollgruppe. Eine 5-tägige kombinierte Applikation von Hydralazin und SC-58236 führte zu einem relativen Anstieg der PRA um den Faktor 6,4 gegenüber der SC-58236-Kontrollgruppe (Abb. 43B).

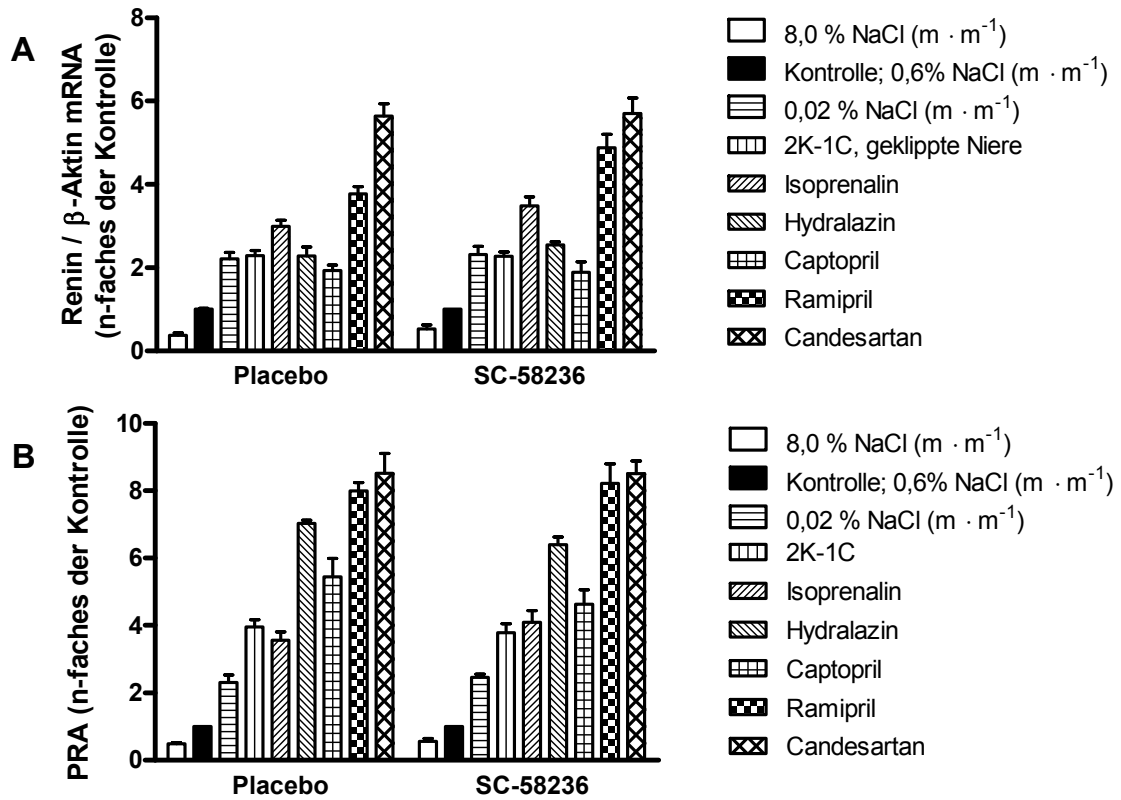


Abb. 43: Effekt von SC-58236 ($10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$) oder Placebo auf die relative Expression der Renin-mRNA (A) bzw. die relative PRA (B) als Antwort auf verschiedene Modulatoren des Renin-Systems. Angegeben ist der MW \pm SEM von $n = 8$ Tieren (Hydralazin $n = 4$ Tiere).

Zusätzlich gibt es eine strenge Korrelation zwischen der mittleren Renin-mRNA-Abundanz und der PRA ($r^2=0,86$, slope $P < 0,0001$, Abb. 44).

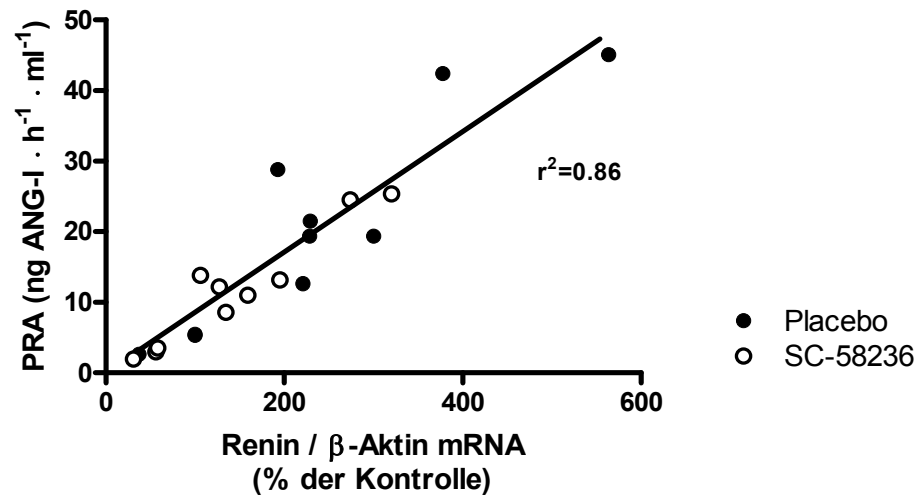


Abb. 44: Verhältnis zwischen mittlerer Renin-mRNA-Abundanz und mittlerer PRA in mit (offene Kreise) oder ohne (gefüllte Kreise) SC-58236-behandelten Ratten mit Regressionsgerade. $r^2 = 0,86$, slope $P < 0,0001$.

Für den relativen Anstieg der Renin-mRNA-Abundanz in Tieren, die 48 h mit Furosemid behandelt wurden, ergibt sich gegenüber der unbehandelten Kontrolle ein Faktor von 3,1, bei gleichzeitiger Applikation von SC-58236 über zwei bzw. 7 Tage gegenüber den jeweiligen SC-58236-Kontrollgruppen jeweils der Faktor 2,1 (Abb. 45A).

Ebenso ergeben sich für die PRA die Faktoren 5,9, 2,9 und 2,7 (Abb. 45B).

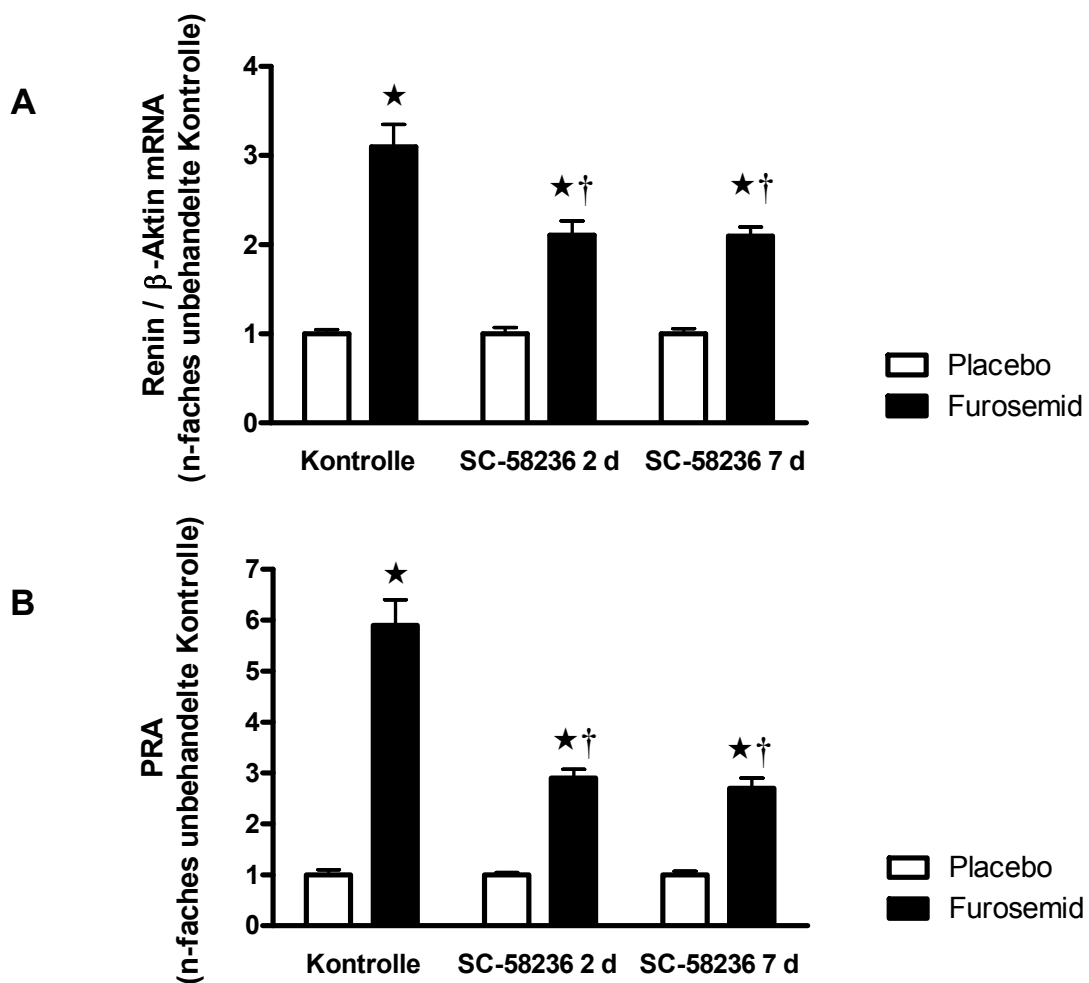


Abb. 45: Effekt der Applikation von SC-58236 ($10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$) für zwei bzw. 7 Tage in der Kombination mit einer Infusion von Furosemid ($12 \text{ mg} \cdot \text{d}^{-1}$) über 48 h auf die relativen Anstiege der Renin-mRNA (A) bzw. PRA (B). Angegeben ist der MW \pm SEM von $n = 8$ Tieren. ★ $p < 0,05$ vs. jeweilige Kontrollgruppe. † $p < 0,05$ vs. Furosemid allein.

5.5 Einfluss des selektiven COX-1-Inhibitors SC-560 auf die Bildung und Freisetzung von Renin durch ausgewählte Modulatoren des Renin-Systems

Um eine Beteiligung COX-1-gebildeter Prostaglandine an der Regulation des Renin-Systems zu bestimmen, wurden zusätzlich Versuche mit dem selektiven COX-1-Inhibitor SC-560 durchgeführt. Hierbei erfolgte zunächst eine nähere Charakterisierung der Effekte einer 7-tägigen Applikation von $20 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ SC-560 auf die Regulation der COX-1- und COX-2-mRNA-Expression, die PGE₂-Freisetzung sowie die Reninbildung und -freisetzung im Nierencortex. Anschließend wurde der Einfluss auf die Regulation des Renin-Systems durch ausgewählte Modulatoren untersucht.

5.5.1 Effekte von SC-560 nach 7 Tagen

Der COX-1-Inhibitor SC-560 wurde einmal täglich in einer Dosierung von $20 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ über eine Schlundsonde verabreicht. Die letzte Applikation erfolgte am Tag vor der Dekapitation.

5.5.1.1 Plasmakonzentration von SC-560

Bei der Applikation von $20 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ SC-560 über einen Zeitraum von 7 Tagen konnte eine Plasmakonzentration von $300 \pm 16 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ bestimmt werden. Dies entspricht einer molaren Konzentration von $0,85 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$.

5.5.1.2 Expression der COX-1- und COX-2-mRNA im Nierencortex

Der COX-1-Inhibitor SC-560 beeinflusste weder die Expression der COX-1- noch der COX-2-mRNA signifikant (Abb. 46).

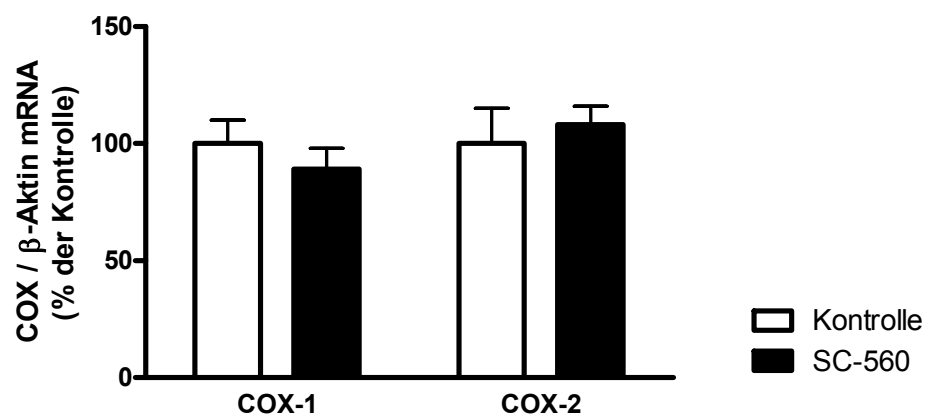


Abb. 46: Effekt von SC-560 ($20 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$) auf die Expression der COX-1- und COX-2-mRNA im Nierencortex. Die Bestimmung der mRNA erfolgte mittels Realtime RT-PCR und wurde auf β -Aktin standardisiert. Angegeben ist der MW \pm SEM von $n = 8$ Tieren.

5.5.1.3 Konzentration von PGE₂ in Nierencortex und Urin

Bei Applikation von SC-560 wurde nach 7 Tagen eine Senkung der Gewebekonzentration von $2,3 \pm 0,1$ auf $0,9 \pm 0,1$ ng PGE₂ pro mg Protein im Nierencortex festgestellt. Im Urin sank die Konzentration an PGE₂ von $44,8 \pm 8$ auf $26,6 \pm 4$ ng \cdot d⁻¹ (Abb. 47).

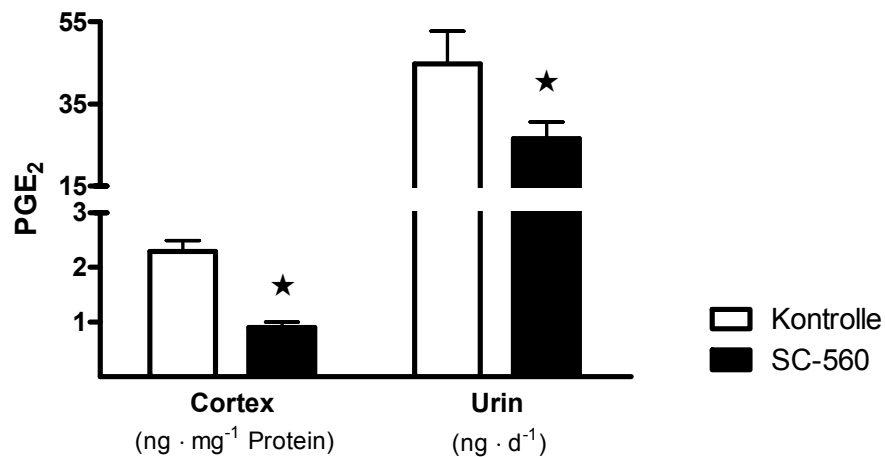


Abb. 47: Effekt von SC-560 ($20 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$) auf die PGE_2 -Konzentration im Nierencortex (links) und im Urin (rechts). Die Bestimmung der PGE_2 -Konzentration erfolgte mittels ELISA. Angegeben ist der $\text{MW} \pm \text{SEM}$ von $n = 8$ Tieren. $\star p < 0,05$ vs. Kontrolle.

5.5.1.4 Beeinflussung der Reninexpression und -freisetzung

Die Expression der Renin-mRNA wurde durch die einwöchige Applikation von SC-560 nicht beeinflusst (98 ± 11 % der Kontrolle).

Ebenso konnte keine Senkung der PRA festgestellt werden. Hierbei wurden Werte von $3,7 \pm 0,6$ in der Kontrollgruppe und $3,5 \pm 0,4 \text{ ng Ang-I} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{mL}^{-1}$ in der SC-560-Gruppe bestimmt.

5.5.1.5 Beeinflussung des systolischen Blutdrucks und der Herzfrequenz

Durch die Applikation von SC-560 wurden weder der systolische Blutdruck noch die Herzfrequenz beeinflusst (Tab. 12).

	sBP (mmHg)	HF (Schläge · min ⁻¹)
Kontrolle	128 ± 3	398 ± 7
SC-560	133 ± 4	390 ± 6

Tab. 12: Effekt von SC-560 (20 mg · kg⁻¹ · d⁻¹) auf den systolischen Blutdruck (sBP) und die Herzfrequenz (HF). Die Bestimmung der Werte erfolgte an der Rattenschwanzarterie. Angegeben ist der MW ± SEM von n = 8 Tieren.

5.5.2 Einfluss von SC-560 auf die Aktivierung des Renin-Systems durch ausgewählte Modulatoren

Der COX-1-Inhibitor SC-560 (20 mg · kg⁻¹ · d⁻¹) wurde in Kombination mit verschiedenen Modulatoren des Renin-Systems verabreicht. Hierbei handelt es sich um eine einwöchige Hochsalz- oder Niedrigsalzdiät (8 bzw. 0,02 % NaCl m · m⁻¹), eine einwöchige Applikation von Ramipril (10 mg · kg⁻¹ · d⁻¹) bzw. Candesartan (15 mg · kg⁻¹ · d⁻¹), eine Infusion von Furosemid (12 mg · d⁻¹) über 48 h sowie eine Nierenarterienstenose durch linksarterielles Klippen (2K-1C) für zwei Tage.

Die zusätzliche Applikation von SC-560 veränderte die Renin-mRNA-Abundanz im Vergleich zur jeweiligen Placebogruppe nicht. Ausnahme ist hierbei die Applikation von Furosemid. In der Placebogruppe wurde dort die mRNA-Expression auf 178 % gegenüber der unbehandelten Kontrollgruppe erhöht. Durch gleichzeitige Applikation von SC-560 verminderte sich diese auf 147 % der unbehandelten Kontrollgruppe (Abb. 48A).

Gleichermaßen wurde die PRA reguliert. In keiner Versuchsgruppe wurde bei gleichzeitiger Applikation von SC-560 die PRA gegenüber der jeweiligen Placebogruppe gesenkt. Die Ausnahme ist wiederum in den mit Furosemid behandelten

Gruppen zu finden. Die Infusion von Furosemid erhöhte die PRA von $3,7 \pm 0,6$ auf $55,0 \pm 7$ ng Ang-I \cdot h⁻¹ \cdot mL⁻¹. Zusätzliche Applikation von SC-560 senkte die PRA auf $35,3 \pm 8$ ng Ang-I \cdot h⁻¹ \cdot mL⁻¹ ab (Abb. 48B).

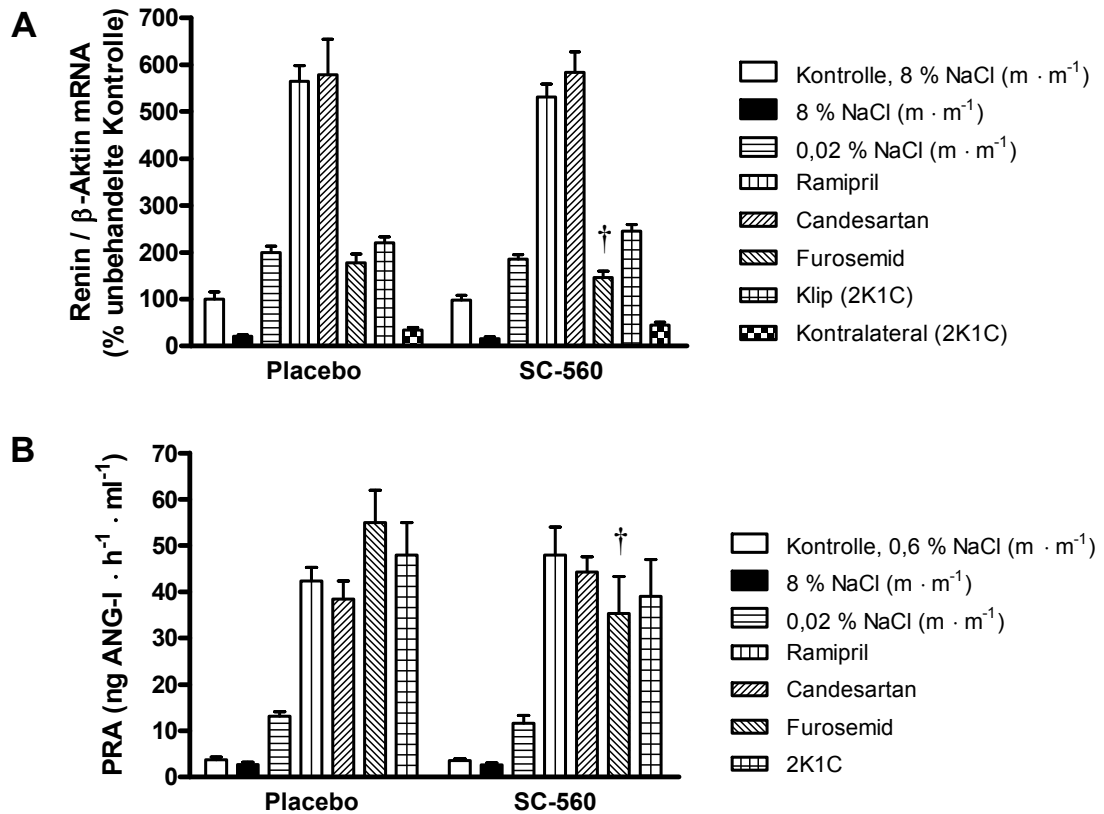


Abb. 48: Effekt der Applikation von SC-560 ($20 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$) auf die Renin-mRNA-Expression im Nierencortex (A) sowie die Reninaktivität im Plasma (B) während einer einwöchigen Hochsalzdiät ($8 \text{ \% NaCl } m \cdot m^{-1}$), einer einwöchigen Nidrigsalzdiät ($0,02 \text{ \% NaCl } m \cdot m^{-1}$), einer einwöchigen Applikation von Ramipril ($10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$) bzw. Candesartan ($15 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$), einer Infusion von Furosemid ($12 \text{ mg} \cdot \text{d}^{-1}$) über 48 h, sowie einer Nierenstenose durch linksarterielles Klippen (2K-1C) für zwei Tage. Die Bestimmung der mRNA erfolgte mittels Realtime RT-PCR und wurde auf β -Aktin standardisiert, die Bestimmung der PRA erfolgte mittels RIA. Angegeben ist der MW \pm SEM von $n = 4$ Tieren. $\dagger p < 0,05$ vs. Furosemid allein.

6 Diskussion

Die Regulation des Salz- und Wasserhaushalts des Körpers sowie des Blutdrucks erfolgt in erster Linie über das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System. Zahlreiche auf das RAAS stimulatorisch wirksame Einflüsse wurden in den letzten Jahrzehnten charakterisiert, jedoch sind die bis zur Reninfreisetzung nötigen Regulationsmechanismen noch nicht vollständig aufgeklärt. Zu den als mögliche Botenstoffe in Betracht kommenden Substanzen zählen COX-gebildete Prostaglandine. Zum einen sind PGE₂ und PGI₂ in der Lage, die Reninexpression und –freisetzung direkt zu stimulieren, zum anderen wurde in Untersuchungen mit NSAR festgestellt, dass bei Hemmung der Cyclooxygenasen der Anstieg der PRA als Antwort auf verschiedene Stimuli vermindert wird. Nach der Charakterisierung der COX-2 und Darstellung selektiver COX-2-Inhibitoren wurde verstärkt die Funktion der über dieses Enzym gebildeten Prostaglandine für die Regulation des Renin-Systems untersucht. Die Enzyme Renin und COX-2 werden in der Rattenniere nicht nur in enger anatomische Nähe exprimiert, sondern häufig auch durch die gleichen Stimuli parallel reguliert. Unter Verwendung der in der therapeutischen Praxis eingesetzten COX-2-Inhibitoren Celecoxib und Rofecoxib konnte kein Einfluss COX-2-gebildeter Prostaglandine auf die Bildung und Freisetzung von Renin in der Niere festgestellt werden. Andere Arbeitsgruppen zeigten jedoch mit den experimentellen selektiven Inhibitoren SC-58236 und SC-58125 Gegenteiliges. Widersprüchliche Ergebnisse wurden auch mit COX-2-Knock-out-Mäusen erhalten, wobei hier die Arbeitsgruppen Tiere mit verschiedenen genetischen Hintergründen verwendeten. Ziel der Untersuchungen dieser Arbeit sollte es daher sein, den Beitrag COX-2-gebildeter Prostaglandine zur Synthese der Renin-mRNA und Sekretion von Renin in die Blutbahn mittels des COX-2-selektiven Inhibitors SC-58236 näher zu charakterisieren. Dazu wurde der Effekt von SC-58236 in der von anderen Arbeitsgruppen ebenso verwendeten Dosierung von 10 mg · kg⁻¹ · d⁻¹ (24, 151) auf bekannte Stimuli des RAAS zeitabhängig untersucht.

6.1 Einfluss des selektiven COX-2-Inhibitors SC-58236 auf die Bildung und Freisetzung von Renin

Einfluss auf die Expression der COX-1- und COX-2-mRNA sowie die Bildung von PGE₂ in der Nierenrinde

Die Zellen des dicken aufsteigenden Astes der Henle-Schleife sowie Macula densa-Zellen bilden die Hauptorte der renocorticalen COX-2-Expression (45). Bereits nach der Verabreichung einer Einzeldosis SC-58236 konnte eine signifikante Senkung der PGE₂-Konzentration sowohl im Urin als auch im Nierencortex auf ca. 50 – 60 % festgestellt werden, die durch weitere Behandlung keine stärkere Reduzierung erfuhr. Das Ausmaß der Prostaglandin-Synthese-Hemmung durch den COX-2-Inhibitor SC-58236 entspricht Befunden Anderer (139). Das bedeutet, dass die COX-2-Aktivität im Nierencortex bereits nach einmaliger Gabe von SC-58236 effektiv gehemmt wurde. Wie bereits in früheren Arbeiten mit anderen COX-2-Inhibitoren gezeigt, wurde gegenregulatorisch die COX-2-mRNA-Expression erhöht (59, 70). Dies dient wahrscheinlich dazu, die verminderte Enzymaktivität zu kompensieren. Da dieser Vorgang längere Zeit in Anspruch nimmt als die Aktivitätssenkung der COX-2, erreicht die Senkung der Expressionsrate erst nach zwei Tagen signifikante Werte. Die Hemmung der COX-2-Aktivität scheint jedoch weiterhin vollständig zu sein, da trotz der gesteigerten COX-2-mRNA-Abundanz keine Erhöhung der PGE₂-Konzentration im Nierencortex festzustellen war. In Übereinstimmung mit Ergebnissen, die mit dem COX-2-Inhibitor Celecoxib erhalten wurden, wurde die COX-1-mRNA-Expression hingegen nicht beeinflusst (59), weshalb sich vermuten lässt, dass dieses Enzym nicht inhibiert wurde und die Bildung der restlichen Menge an PGE₂ hierüber erfolgen konnte.

Plasmakonzentration von SC-58236 nach 7 Tagen

Um Aussagen über die Selektivität des COX-2-Inhibitors treffen zu können, wurde die Plasmakonzentration von SC-58236 bestimmt. Bei einmal täglicher Applikation von SC-58236 konnten mittels HPLC Plasmakonzentrationen in Höhe von 15,2 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ nach 24 h und bis zu 46,3 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ nach 7 Tagen festgestellt werden. Hierbei ist

festzuhalten, dass die gemessene Konzentration an Tag 7 der maximal vorliegenden Konzentration entspricht, da die letzte Gabe des COX-2-Inhibitors zwei Stunden vor der Dekapitation erfolgte.

Selektivität

Aufgrund der hohen gemessenen Plasmakonzentrationswerte, die in einem Bereich liegen, die in *in-vitro*-Untersuchungen auch die COX-1 hemmen (106), war es nötig, die Substanz SC-58236 näher zu charakterisieren. Deshalb wurde eine modifizierte *in-vivo*-Selektivitätsbestimmung durchgeführt. Herkömmliche Versuchsanordnungen nach dem air pouch-Modell sehen eine einmalige Verabreichung der zu untersuchenden Substanz etwa eine Stunde vor Carrageenan-Applikation vor. Da für die folgenden Versuche jedoch die Selektivität bei der höchsten vorliegenden Konzentration von Interesse war, wurde SC-58236 diesmal über 7 Tage hinweg verabreicht und erst am letzten Tag die Entzündungsreaktion hervorgerufen. Es zeigte sich, dass in der vorliegenden Plasmakonzentration von $46,3 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ die COX-2-abhängige PGE₂-Bildung im Exsudat komplett unterdrückt wurde. Die Freisetzung des COX-1-abhängig gebildeten TxB₂ aus den Blutplättchen wurde aufgrund großer Streuungen in der Kontrollgruppe nicht signifikant gesenkt. Es ist jedoch durchaus möglich, dass zumindest im Plasma eine signifikante Hemmung der COX-1 stattfinden könnte, da der von Penning *et al.* mittels rekombinanter Enzyme bestimmte IC₅₀-Wert für SC-58236 bei $17,8 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ liegt (106). Ähnlich schwankende TxB₂-Werte wurden auch durch andere Arbeitsgruppen gefunden, die die Selektivität von $15 \text{mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ SC-58236 in Hunden bestimmten (41). Um eine Beeinflussung COX-1-gebildeter Prostaglandine genauer zu charakterisieren, wurde zudem die Freisetzung des COX-1-abhängig gebildeten PGE₂ im Magen untersucht. Dieser Assay ist bereits mehrfach beschrieben und zeigt z. B. für den COX-1-selektiven Inhibitor SC-560 in einer Dosierung von $40 \text{mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$, dass diese Substanz die COX-1-abhängige PGE₂-Synthese hemmt, während durch Celecoxib ($15 \text{mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$) keine Hemmung festzustellen ist (150). Nachdem SC-58236 die PGE₂-Bildung im Magen nicht verändert, ist anzunehmen, dass SC-58236 die COX-1-Aktivität im Gewebe kaum hemmt. Dies könnte möglicherweise daran liegen, dass die Gewebekonzentration von SC-58236 geringer als die Plasmakonzentration ist und somit keine Hemmung der COX-1-abhängigen

PGE₂-Synthese stattfindet. Paulson *et al.* fanden für das zu SC-58236 strukturanaloge Celecoxib unterschiedliche Konzentrationen in verschiedenen Geweben der Ratte, wobei im Magen die mit Abstand höchste Menge Celecoxib gefunden wurde (105). Es ist zu vermuten, dass dieses auch für das strukturanaloge SC-58236 gilt. Dementsprechend ist anzunehmen, dass SC-58236 die COX-1-abhängige Prostaglandin-Synthese in der Niere nicht beeinflusst.

Einfluss auf die Bildung und Freisetzung von Renin

Interessant war nun der zeitabhängige Effekt von SC-58236 auf die Renin-mRNA-Abundanz sowie die PRA. Hier konnte für beide Werte eine Verminderung nach 5-tägiger Behandlung gefunden werden. Die Senkung entspricht den verminderten basalen Renin-Konzentrationen, die in COX-2-Knock-out-Mäusen gefunden wurden (73, 156). Dies zeigt, dass die COX-2 in die Kontrolle der basalen Reninaktivität involviert ist. Die Freisetzung von Renin aus den JG-Zellen in die Blutbahn ist im Vergleich zur mRNA-Synthese ein schneller Prozess. Obwohl die Prostaglandinkonzentration sowohl im Urin als auch im Nierencortex bereits nach einmaliger Applikation von SC-58236 signifikant reduziert war, erfolgte die parallele Senkung von Renin-mRNA und PRA erst nach weiteren Applikationen des COX-2-Inhibitors. Infolgedessen scheint die Verminderung der PRA auf die Senkung der Renin-mRNA-Expression zurückzuführen zu sein, welche *in vitro* über Stunden hinweg erfolgt und *in vivo* länger dauern könnte. Dafür sprechen auch Daten aus einer Untersuchung an isoliert perfundierten Nieren, die keinen Einfluss einer akuten COX-2-Inhibition auf die basale Reninsekretion aufzeigen (18).

Auch sekundäre Mechanismen könnten für die späte Senkung der mRNA-Expression und PRA verantwortlich sein. Es wurde bereits mehrfach gezeigt, dass nicht nur eine unselektive COX-Hemmung, sondern auch die selektive COX-2-Inhibition per se den systemischen Blutdruck erhöht und eine verminderte Salz- und Wasserausscheidung zur Folge hat (100, 116, 118). Durch beide Prozesse wird das RAAS gehemmt. Die festgestellte geringfügige Steigerung des systolischen Blutdrucks könnte also durchaus an dem oben genannten Regulationsprozess beteiligt sein. Dem stehen Untersuchungen an SHR- und WKY-Ratten gegenüber, deren Daten zeigen, dass eine 4-wöchige

Behandlung mit Rofecoxib zwar signifikant den systolischen Blutdruck erhöht, jedoch keinen Einfluss auf die Renin-mRNA-Expression oder die PRA hat (56). Trotz allem kann der Einfluss des systolischen Blutdrucks auf das RAAS in der hier vorliegenden Arbeit nicht ausgeschlossen werden. Weiterhin wird eine direkte Hemmung verschiedener Adenylylcyclase-Isoformen durch das zu SC-58236 strukturanaloge Celecoxib beschrieben, wodurch es zu einer Senkung der Reninfreisetzung kommen könnte. Allerdings sind hierfür hohe mikromolare Konzentrationen von Celecoxib und dementsprechend wahrscheinlich auch SC-58236 nötig (121), die in den hier vorliegenden Versuchsreihen nicht erreicht werden.

Diese basalen Effekte von SC-58236 beeinflussen nun auch den weiteren Versuchsaufbau. Wenn COX-2-gebildete Prostaglandine als Signalmoleküle für die Aktivierung des RAAS notwendig sein sollten, müsste die Hemmung der COX-2-abhängigen Synthese dieser Prostaglandine auch die Effekte von RAAS-stimulatorischen Substanzen oder Manipulationen auf die Reninexpression und -freisetzung vermindern. Hierbei sollte bereits eine zweitägige Applikation von SC-58236, die, wie bereits beschrieben, die COX-2-abhängige PGE₂-Synthese wirksam hemmt, ohne die Reninsekretion per se zu beeinflussen, in der Lage sein, den Anstieg der Reninparameter zu vermindern oder komplett aufzuheben. Da andere Arbeitsgruppen bisher jedoch nur den Effekt einer einwöchigen COX-2-Hemmung mittels SC-58236 untersuchten (24, 46, 151), bei der bereits die basale Reninaktivität im Plasma abfällt, wurde bei den Versuchsgruppen, bei denen maximal eine zweitägige Stimulation des Renin-Systems erfolgen konnte, zusätzlich eine 5-tägige Vorbehandlung mit dem COX-2-Inhibitor durchgeführt. Es wurde untersucht, ob COX-2-gebildete Prostaglandine in die Aktivierung des Renin-Systems durch Applikation von ACE-Hemmern oder AT₁-Rezeptorantagonisten, durch Gabe des Schleifendiuretikums Furosemid, bei Nidrigsalzdiät, Nierenarterienstenose, bei β -adrenerger Stimulation durch Isoprenalin oder Applikation von Hydralazin involviert sind.

Einfluss von SC-58236 auf die Stimulation des Renin-Systems durch ACE-Inhibitoren oder AT₁-Rezeptorantagonisten

Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen zeigten, dass COX-2-gebildete Prostaglandine Signalmoleküle für die Stimulation des Renin-Systems nach pharmakologischer Hemmung des negativen Feedbacks durch ACE-Inhibitoren bzw. AT₁-Rezeptorantagonisten sein könnten, da zum einen eine einwöchige Behandlung mit SC-58236 unter gleichzeitiger Captopril-Gabe die Reninexpression und -freisetzung vermindert, zum anderen in COX-2-Knock-out-Mäusen gemischten Hintergrunds durch Captopril-Behandlung kein Anstieg der mRNA bzw. der PRA festzustellen war (24, 25).

In Übereinstimmung zu früher publizierten Daten (24, 61, 70), erhöhten die ACE-Inhibitoren Captopril und Ramipril sowie der AT₁-Rezeptorantagonist Candesartan in der hier vorliegenden Versuchsreihe sowohl die COX-2-mRNA-Expression als auch die PGE₂-Konzentration im Nierencortex, ohne dabei die COX-1-mRNA-Expression zu modulieren. Die Applikation von SC-58236 verminderte den durch alle drei Substanzen vermittelten PGE₂-Anstieg effizient auf die gleiche absolute Größe wie in der SC-58236-behandelten Kontrollgruppe, war allerdings nur in der Captopril-Gruppe auch in der Lage, die COX-2-mRNA-Abundanz zu erhöhen. Warum die zusätzliche Applikation von SC-58236 keinen weiteren Effekt auf den Anstieg der COX-2-mRNA-Abundanz bei der Gabe von Ramipril bzw. Candesartan hat, kann nur vermutet werden. Es ist möglich, dass die COX-2-mRNA-Abundanz bereits durch alleinige Applikation der beiden Substanzen ein Maximum im Nierencortex erreicht hat und deswegen keine weitere Stimulation erfolgen konnte.

Wie bereits durch Cheng *et al.* gezeigt, erhöhte der aufgrund seiner kurzen Halbwertszeit im Vergleich zu Ramipril schwächere ACE-Inhibitor Captopril die Renin-mRNA-Abundanz sowie die PRA, während durch gleichzeitige Applikation des COX-2-Inhibitors dieser Anstieg vermindert wurde (24). Gleichwohl war die relative Antwort noch vorhanden. Die basalen Reninparameter der mit SC-58236-behandelten Kontrollgruppe zugrunde gelegt, wurde durch die Gabe von Captopril ein vergleichbarer relativer Anstieg der Renin-mRNA-Abundanz sowie der PRA verzeichnet, ähnlich wie in den Placebo-behandelten Gruppen. Übereinstimmend mit

früheren Befunden erhöhten der potentere ACE-Inhibitor Ramipril und der AT₁-Rezeptorantagonist Candesartan die Reninexpression und -freisetzung stärker (15, 61), während gleichzeitige SC-58236-Applikation den absoluten Anstieg der Renin-mRNA und der PRA senkte. Dennoch wurde auch hier der relative Anstieg der Renin-Genexpression und -freisetzung nicht beeinflusst, so dass anzunehmen ist, dass COX-2-gebildete Prostaglandine nicht essenziell für die Stimulation des Renin-Systems durch Hemmung des negativen Feedbacks sind. Die jüngsten Arbeiten an COX-2-defizienten Mäusen von Kim *et al.* bestätigen diese Vermutung und sprechen für eine Senkung der basalen Reninwerte bei dementsprechend verminderter absoluter Stimulierbarkeit des Renin-Systems (73).

Die in der Kombination mit Candesartan durchgeführten Untersuchungen zur Dosierung des COX-2-Inhibitors zeigen, dass eine Dosierung von $1,0 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ SC-58236 im Prinzip für eine Senkung der PGE₂-Konzentration sowie eine Verminderung der Renin-mRNA-Abundanz sowie der PRA ausreichend wäre. Für eine sichere Hemmung der PGE₂-Bildung im Tiermodell Ratte ist jedoch die in den Versuchen verwendete Dosierung von $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ zu empfehlen. In dieser Dosierung wurde auch die stärkste Verminderung der Reninparameter gefunden.

Mit den beiden ACE-Inhibitoren sowie dem AT₁-Rezeptorantagonisten konnte eine effiziente Senkung des systolischen Blutdrucks erzielt werden. Da gleichzeitig mit der SC-58236-Applikation auch der Blutdruckabfall in allen Versuchsgruppen vermindert wurde, kann ein sekundärer Effekt des Blutdrucks auf das Renin-System mit diesem Versuchsaufbau nicht ausgeschlossen werden. Dem steht jedoch eine Arbeit an SD-Ratten gegenüber, in der der AT₁-Rezeptorantagonist Candesartan kombiniert mit einem anderen COX-2-Inhibitor über 5 Tage hinweg appliziert wurde. Celecoxib war hier nicht in der Lage, den Anstieg der Renin-mRNA-Abundanz zu vermindern, obwohl in dieser Studie der Blutdruck signifikant gegenüber alleiniger Applikation von Candesartan erhöht wurde (61)

Einfluss von SC-58236 auf die salzabhängige Regulation des Renin-Systems

Die Stimulation des RAAS als Antwort auf eine verminderte Salzzufuhr und somit verminderte Salzkonzentration an den Macula densa-Zellen wird mit der Wirkung COX-2-gebildeter Prostaglandine als Signalmoleküle in Verbindung gebracht (36, 155). Jedoch ist eine solche Diät erst nach einer Woche ausreichend wirksam, so dass nur der Effekt einer einwöchigen Applikation von SC-58236 untersucht werden konnte. Entsprechend früherer Ergebnisse wurde die Reninexpression und –freisetzung durch die Nidrigsalzdiät erhöht, während eine Hochsalzdiät die Senkung dieser zur Folge hatte (59). SC-58236 verminderte wie zuvor in COX-2-defizienten und SC-58125-behandelten Mäusen den absoluten Anstieg der Renin-mRNA und der PRA durch Nidrigsalzdiät (36, 155). COX-2-gebildete Prostaglandine scheinen jedoch nicht essenziell für diese Regulation zu sein, da der relative Anstieg beider Parameter durch die Stimulation mittels Nidrigsalzdiät im Verhältnis zur unbehandelten bzw. mit SC-58236 behandelten Kontrolle vergleichbar ist. Gleichermaßen verhält es sich bei der Hemmung des Renin-Systems durch eine Hochsalzdiät, wobei durch COX-2-Inhibition ein weiterer Abfall in der Reninexpression und –freisetzung zu verzeichnen war. SC-58236 beeinflusste den Blutdruck in der Nidrigsalzgruppe nicht, was ein Indiz für eine druckunabhängige Regulation der Reninparameter darstellt.

Einfluss von SC-58236 auf die Stimulation des Renin-Systems durch Furosemid

Schleifendiuretika wie Furosemid hemmen den $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-2Cl}^-$ -Cotransporter (NKCC2), der auch in den Macula densa-Zellen des juxtaglomerulären Apparates lokalisiert ist. Es wird vermutet, dass über diesen Transporter die luminale Salzkonzentration detektiert wird. Die Hemmung des NKCC2 sollte, wie bereits dargelegt, zu einer Stimulation des Renin-Systems führen. Wie bereits mehrfach beschrieben, erhöht eine zweitägige Infusion von Furosemid die Reninexpression und –freisetzung (21, 60, 91). Es wird davon ausgegangen, dass diese Stimulation Prostaglandin-abhängig ist (40, 141). Im Gegensatz zu den anderen verwendeten Modulationen sanken bereits bei zusätzlicher Applikation von SC-58236 für zwei Tage die Renin-mRNA-Abundanz und die PRA signifikant. Dieser Befund spricht für die benannte These. Allerdings ist die hemmende Wirkung des COX-2-Inhibitors auf die Induktion der Renin-mRNA und PRA durch

Furosemid nicht vollständig, so dass ein Teil der RAAS-Stimulation auch über andere Signalmoleküle ablaufen könnte. Desweiteren vermindern COX-2-Inhibitoren die durch Furosemid-induzierte Diurese und Natriurese deutlich (Daten nicht gezeigt). Es ist deshalb nicht auszuschließen, dass sich diese beiden Effekte über einen anderen Mechanismus als die Macula densa-abhängige Kontrolle der luminalen Salzkonzentration auf das Renin-System auswirken.

Einfluss von SC-58236 auf die Stimulation des Renin-Systems durch eine Nierenarterienstenose

Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen lassen vermuten, dass auch die Stimulation des RAAS durch eine renale Hypoperfusion von COX-2-gebildeten Prostaglandinen abhängig ist (36, 151). Übereinstimmend mit diesen Befunden erhöhte die Nierenarterienstenose, hervorgerufen durch Einengen der linken Nierenarterie durch Anlegen eines Klips, nach zwei Tagen die Reninexpression sowie den systemischen Blutdruck (92). Wie bereits vorher für andere Stimuli gezeigt, wurde auch hier bei gleichzeitiger Applikation des COX-2-Inhibitors SC-58236 die Renin-mRNA sowie die PRA nicht beeinflusst, während die Vorbehandlung zu einem deutlichen Anstieg beider Parameter führte. Auch in anderen Modellen wurden zuvor ähnliche Ergebnisse erhalten. So nutzen Wang *et al.* (151) das Abbinden der suprarenalen Aorta zur Erzeugung einer systemischen Hypertension bei gleichzeitig verminderter Nierendurchblutung. Eine gleichzeitige einwöchige Behandlung mit SC-58236 verminderte zwar den absoluten Anstieg der Renin-mRNA und der PRA, jedoch wurden die Kontrollwerte noch immer um den Faktor zwei übertroffen. Den Schluss, dass COX-2-gebildete Prostaglandine für die Stimulation des RAAS verantwortlich sind, zogen diese Autoren, ohne zuvor die basalen Effekte von SC-58236 untersucht zu haben. Die in dieser Arbeit dargelegten Werte weisen hingegen deutlich darauf hin, dass die hemmende Wirkung des COX-2-Inhibitors auf die Senkung der basalen Reninwerte zurückzuführen ist, während die alleinige Hemmwirkung auf die Synthese COX-2-gebildeter Prostaglandine nach zwei Tagen keinen Einfluss zu haben scheint. Außerdem unterscheiden sich die relativen Anstiege der Renin-mRNA und der PRA zur jeweils gleichermaßen mit SC-58236 behandelten Kontrollgruppe nicht von denen der Placebo-behandelten Gruppen. Desweiteren wird diese Schlussfolgerung durch Daten einer

anderen Arbeitsgruppe gestützt, die mittels des unselektiven COX-Inhibitors Meclofenamat eine Beteiligung von Prostaglandinen an der Reninstimulation durch Abbinden der suprarenalen Aorta ausschlossen (145). Die Erhöhung der COX-2-mRNA-Abundanz in der geklippten Niere bzw. deren Senkung in der kontralateralen Niere stimmen mit den Ergebnissen früherer Untersuchungen überein (91).

Einfluss von SC-58236 auf die Aktivierung des Renin-Systems durch Hydralazin

Hydralazin ist ein potenter Vasodilatator, der über einen noch unbekanntem Mechanismus direkt die glatten arteriolen Muskeln relaxiert, ohne dabei den Gefäßtonus der Venen zu beeinflussen. Die Stimulation der Reninfreisetzung scheint eine Folge des sinkenden Blutdrucks zu sein, da in Untersuchungen an der isoliert perfundierten Niere keine direkte Stimulation des RAAS durch Hydralazin zu beobachten war (unveröffentlichte Daten von Frank Schweda, Institut für Physiologie, Universität Regensburg). Vielmehr sollte die Aktivierung des RAAS sekundär über den renalen Barorezeptor-Signalweg erfolgen. Somit wäre Hydralazin eine gute Substanz, um die Aktivierung dieses Reaktionsweges *in vivo* zu untersuchen. Wie aus den Ergebnissen ersichtlich, kommt es durch die orale Applikation von Hydralazin bei den verwendeten SD-Ratten bereits nach 6 h zu einer effektiven Blutdrucksenkung, die nach 24 h ein Maximum erreicht. Die durch diese Blutdrucksenkung bedingte Aktivierung des sympathischen Nervensystems führt zu einer Erhöhung der Herzfrequenz. Diese zeitabhängigen Befunde werden durch Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen an Hunden bestätigt (2, 3). Interessanterweise wird auch die COX-2-mRNA-Abundanz innerhalb von 12 h gesteigert, so dass es zu einer vermehrten PGE₂-Freisetzung im Nierencortex kommt. Parallel mit der PGE₂-Konzentrationserhöhung wird die Renin-mRNA-Abundanz erhöht, so dass man hier einen Zusammenhang zwischen COX-2-gebildeten Prostaglandinen und der Reninexpression vermuten könnte. Der gemessene zeitabhängige Anstieg der PRA durch die orale Gabe von Hydralazin wurde auch in Humanstudien gefunden (85). Bereits in den 1980er Jahren wurde anhand von Untersuchungen mit dem unselektiven COX-Inhibitor Indomethacin die These aufgestellt, dass Prostaglandine die Hydralazin-induzierte Synthese und Freisetzung von Renin beeinflussen (7, 12, 111, 137). Die Aktivierung des Renin-Systems wird für den Anstieg des systolischen Blutdrucks bei Langzeitgabe verantwortlich gemacht (2). Auch

andere Arbeitsgruppen konnten durch 12-wöchige Behandlung mit Hydralazin in Hasen nur einen Blutdruckabfall um 10 mmHg feststellen, wie er in dieser Versuchsreihe nach 5 Tagen wieder erreicht wurde (43). Bei gleichzeitiger Applikation des COX-2-Inhibitors SC-58236 konnte nur noch eine verminderte Blutdrucksenkung beobachtet werden, wobei diese bereits nach zwei Tagen nicht mehr vorhanden war und nach 5 Tagen über die Kontrollwerte anstieg. Gleichzeitig wurde jedoch die Herzfrequenz nicht beeinflusst. Während bei der Untersuchung der Renin-mRNA-Abundanz kein Unterschied zur alleinigen Applikation von Hydralazin festzustellen war, sank die PRA auf etwa 74 %. Gleiche Ergebnisse wurden auch mit Indomethacin erhalten (12, 13). Diese Verminderung der PRA kann zum einen auf eine verminderte Aktivierung des renalen Barorezeptors, zum anderen aber auch auf eine Verminderung COX-2-gebildeter Prostaglandine im Nierencortex zurückzuführen sein. Letzterem steht jedoch entgegen, dass die relativen Anstiege der Reninexpression und -freisetzung nach 5 Tagen Behandlung mit Hydralazin bzw. Hydralazin in Kombination mit SC-58236 gleiche Werte gegenüber ihren jeweils ohne Hydralazin behandelten Kontrollen aufweisen. Außerdem würde der geringe Abfall der PRA eher auf einen geringen Einfluss der COX-2-gebildeten Prostaglandine hindeuten. Für die Drucktheorie spricht auch, dass der Blutdruck nach 5-tägiger Behandlung mit Hydralazin in etwa dem nach 24-stündiger Applikation von Hydralazin und SC-58236 entspricht und der relative Anstieg der PRA um den Faktor 6,7 bzw. 6,3 vergleichbar ist. Die frühere Senkung der PRA gegenüber der Renin-mRNA-Abundanz lässt sich auf die schnellere Regulation der Reninfreisetzung aus den JG-Zellen zurückführen, während die Senkung der mRNA-Expression ein länger währender Prozess ist.

Es war weiterhin interessant, ob SC-58236 den blutdrucksenkenden Effekt von Hydralazin vermindert oder ob ein anderer Effekt für die Erhöhung des systolischen Blutdrucks verantwortlich ist. Hierbei konnte festgestellt werden, dass sowohl kurzzeitige als auch langzeitige Hemmung der COX-2 durch SC-58236 keinen Einfluss auf die absolute Absenkung des mittleren arteriellen Drucks durch i. v.-appliziertes Hydralazin innerhalb der ersten halben Stunde hat. Für die Blutdruckerhöhung bei kombinierter Gabe von Hydralazin und SC-58236 müssen also andere Effekte als die Senkung der PGE₂-Konzentration eine Rolle spielen, die aber hier nicht näher

untersucht werden konnten. Außerdem war festzustellen, dass die Applikation von Hydralazin i. v. bereits innerhalb von 30 min eine deutliche Steigerung der PRA hervorruft, die geringfügig nach zweistündiger und deutlich nach 5-tägiger Vorbehandlung mit SC-58236 gesenkt wurde, wobei der relative Anstieg der PRA zur jeweiligen Kontrolle in etwa gleiche Werte erreichte. Auch hieraus geht hervor, dass SC-58236 Einfluss auf die basale Reninaktivität, nicht jedoch auf die Stimulierbarkeit durch Hydralazin hat.

Einfluss von SC-58236 auf die Stimulation des Renin-Systems durch Isoprenalin

Um die Relevanz der basalen Reninaktivität für die Stimulation des Renin-Systems zu verdeutlichen, wurde ein Prostaglandin-unabhängiges Modell gewählt. Isoprenalin aktiviert über eine direkte Stimulation von β_1 - und β_2 -Rezeptoren die Reninbildung und -freisetzung. Die Beteiligung von Prostaglandinen an der sympathischen Regulation des RAAS wird jedoch bereits seit längerem ausgeschlossen (50, 58, 76). Übereinstimmend mit diesen Erkenntnissen führte die alleinige Applikation von Isoprenalin weder zu einem Anstieg der COX-1- oder COX-2-mRNA bzw. des Proteins, noch zu einer Veränderung der PGE₂-Konzentration im Nierencortex.

Wie bereits von anderen Arbeitsgruppen gezeigt werden konnte, wurde die Reninexpression und -freisetzung innerhalb von zwei Tagen bei den untersuchten Tieren gesteigert (63, 78). Gleichzeitige Applikation von SC-58236 beeinflusste diese hingegen nicht. Erst die Vorbehandlung mit dem COX-2-Inhibitor senkte sowohl die basale als auch die Isoprenalin-induzierte absolute Renin-mRNA-Expression sowie die PRA, jedoch differierte die relative Antwort auf die Isoprenalin-Stimulation in mit SC-58236 behandelten und unbehandelten Tieren nicht. Diese Daten korrelieren mit Befunden aus COX-2-defizienten Mäusen (73). Außerdem konnten Henrich *et al.* den gleichen Effekt an mit Prenalterol behandelten Hunden mit dem unselektiven COX-Inhibitor Indomethacin nachweisen (50). Auch hier kam es zu einem verminderten absoluten, aber gleichem relativen Anstieg der PRA durch den β -Agonisten bei Vorbehandlung mit Indomethacin. Die hier vorliegenden Befunde sprechen dafür, dass die Applikation von SC-58236 über die Senkung der basalen Reninaktivität auch die maximale Stimulierbarkeit des Renin-Systems vermindert.

Die im Rahmen dieser Dissertation erhaltenen Daten zeigen, dass COX-2-gebildete Prostaglandine eher in die basale Expression und Sekretion von Renin involviert sind als in die Stimulation des Renin-Systems über die verschiedenen beschriebenen Mechanismen. In früheren Publikationen wurde von unterschiedlichen Arbeitsgruppen gezeigt, dass die selektiven COX-2-Inhibitoren Rofecoxib und Celecoxib keinen Einfluss auf die Stimulation des Renin-Systems durch Nidrigsalzdiät, ACE-Hemmung, AT₁-Rezeptorblockade oder renale Hypoperfusion hatten (48, 54, 59, 61, 92, 112). Da hier aber auch die basale Reninaktivität im Gegensatz zu einer 5-tägigen Applikation von SC-58236 keiner Beeinflussung unterlag, ist es möglich, dass die durch andere Arbeitsgruppen gezeigte Hemmung des stimulierten Renin-Systems – mit Ausnahme des Schleifendiuretikums Furosemid - nach Applikation von SC-58236 ein substanzspezifischer Effekt ist. Dagegen sprechen aber Befunde an COX-2-Knock-out-Mäusen die zeigen, dass COX-2-gebildete Prostaglandine in die basale Regulation des Renin-Systems eingreifen (73). Die dort durchgeführten Untersuchungen bestätigen die Befunde, dass COX-2-gebildete Prostaglandine über die Senkung der basalen Reninaktivität die absolute, jedoch nicht die relative Stimulierbarkeit des Renin-Systems durch verschiedene bekannte Modulatoren vermindern. Dementsprechend ist es unwahrscheinlich, dass COX-2-gebildete Prostaglandine in den Signalweg dieser stimulatorischen Mechanismen per se involviert sind. Trotzdem ist ein Effekt COX-2-gebildeter Prostaglandine nicht vollständig auszuschließen, da eine COX-2-abhängig stimulierte Reninsynthese und –freisetzung während der COX-2-Hemmung durch einen selektiven COX-2-Inhibitor über andere Mechanismen kompensiert werden könnte. Es ist jedoch unwahrscheinlich, dass ein Ausgleich über die Induktion von Prostanoidsynthesen erfolgt, da der Anstieg von PGE₂ als Antwort auf verschiedene Stimuli effektiv gehemmt wird. Es wird vermutet, dass die unterschiedliche Wirkung der bisher untersuchten COX-2-Inhibitoren auf das Renin-System durch zu geringe Konzentration der Substanzen an den Zielzellen zurückzuführen ist (73). So konnte zwar für alle COX-2-Inhibitoren eine Hemmung der PGE₂-Bildung aus dem Nierencortex gefunden werden, jedoch ist unklar, ob diese Hemmung an den verschiedenen Zelltypen auch gleichermaßen erfolgt. Hierin könnte die differierende Wirkung von Rofecoxib und Celecoxib auf das basale Renin-System im Vergleich zu SC-58236 begründet sein.

6.2 Einfluss des selektiven COX-1-Inhibitors SC-560 auf die Bildung und Freisetzung von Renin

Um einen Einfluss COX-1-gebildeter Prostaglandine weitestgehend auszuschließen, wurde zusätzlich der Effekt eines selektiven COX-1-Inhibitors auf das basale Renin-System sowie die Renin-mRNA-Genexpression und die Reninfreisetzung in die Blutbahn durch verschiedene Modulatoren untersucht. Der selektive COX-1-Inhibitor SC-560 weist nach Herstellerangaben eine 700-fache Selektivität gegenüber der Hemmung der COX-2 auf. Die angegebenen IC_{50} -Werte für die Hemmung der COX-1 ($9 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$) bzw. COX-2 ($6,3 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) zugrundegelegt, werden in der im Versuch erreichten Konzentration von $0,85 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ etwa 10 % der COX-2-Aktivität inhibiert. Eine andere Arbeitsgruppe konnte bereits nachweisen, dass SC-560 in der Lage ist, 60-70 % der gesamten Prostaglandinsynthese *in vivo* in nahezu allen Geweben zu hemmen (51). Dies konnte in der hier vorliegenden Arbeit für die PGE_2 -Freisetzung im Nierencortex bestätigt werden. Die Hemmung der PGE_2 -Freisetzung im Nierencortex blieb ohne Einfluss auf das Renin-System sowie den systolischen Blutdruck, woraus geschlussfolgert werden kann, dass COX-1-gebildete Prostaglandine keinen Einfluss auf die basale Reninaktivität haben. Ebenso konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die Applikation von SC-560 ohne Einfluss auf die Renin-mRNA-Abundanz bzw. PRA bei Hochsalz- oder Niedrigsalzdiät, Applikation des ACE-Inhibitors Ramipril oder des AT_1 -Rezeptorantagonisten Candesartan sowie Nierenarterienstenose ist. Auch hier scheinen COX-1-gebildete Prostaglandine nicht in die Reninregulation involviert zu sein. Zum gleichen Ergebnis kommt eine andere Arbeitsgruppe, die mittels COX-1 Knock-out-Mäusen einen Einfluss COX-1-gebildeter Prostaglandine an der Stimulation des Renin-Systems durch ACE-Inhibitoren ausschloss (26). COX-1-gebildete Prostaglandine waren jedoch in der Lage die durch das Schleifendiuretikum Furosemid erreichte Stimulation des Renin-Systems teilweise aufzuheben. Hierbei ist allerdings zu beachten, dass sowohl die Furosemid-induzierte Diurese als auch Natriurese durch SC-560 vermindert wurde (Daten nicht gezeigt), weshalb sekundäre Effekte auf das Renin-System nicht ausgeschlossen werden können.

Die Selektivitätsbestimmung für den COX-2-Inhibitor SC-58236 zeigte einen möglichen hemmenden Einfluss auf die Synthese COX-1-abhängiger Prostaglandine. Die Versuchsergebnisse mit dem COX-1-Inhibitor SC-560 legen jedoch die Vermutung nahe, dass die mittels SC-58236 bestimmten basalen Veränderungen der Synthese und Freisetzung von Renin nur auf die Hemmung der COX-2 und nicht der COX-1 zurückzuführen sind.

7 Zusammenfassung

COX-2-gebildete Prostaglandine werden als wichtige Botenstoffe für die Regulation des Renin-Systems als Antwort auf verschiedene Stimuli angesehen. Viele widersprüchliche Ergebnisse zur Rolle COX-2-gebildeter Prostaglandine für die Stimulation des Renin-Systems sind auf die Verwendung unterschiedlicher COX-2-Inhibitoren sowie differierender Studienprotokolle zurückzuführen. Deswegen wurde in der hier vorliegenden Arbeit der selektive COX-2-Inhibitor SC-58236 verwendet, für den eine hemmende Wirkung auf die Reninexpression und -freisetzung bei Stimulation des RAAS gezeigt wurde.

Der selektive COX-2-Inhibitor SC-58236 war in der in den Versuchen eingesetzten Dosierung in der Lage, die PGE₂-Bildung im Nierencortex bereits nach einmaliger Behandlung deutlich auf 60 % der Kontrollwerte zu senken. Die Applikation von SC-58236 senkte die basale Renin-Genexpression sowie die PRA nach 5 Tagen. Dies deutet darauf hin, dass COX-2-gebildete Prostaglandine in die Kontrolle der basalen Reninaktivität involviert sein könnten. Ein Effekt eventuell vermindert gebildeter COX-1-abhängiger Prostaglandine konnte hier mittels des COX-1-selektiven Inhibitors SC-560 ausgeschlossen werden. Um den Einfluss des COX-2-Inhibitors auf die Modulation des Renin-Systems durch akute Stimuli zu untersuchen, wurden die Veränderungen der Renin-mRNA-Abundanz sowie der PRA bei gleichzeitiger Nidrigsalzdiät, ACE-Hemmung, AT₁-Rezeptorblockade, Isoprenalin-Infusion, Nierenarterienstenose bzw. Hydralazin-Gabe untersucht. Es zeigte sich, dass die Senkung der PGE₂-Konzentration im Nierencortex durch SC-58236 nach zweitägiger Behandlung keinen Einfluss auf die durch Isoprenalin oder mittels einer Nierenarterienstenose erzeugte Aktivierung des Renin-Systems hatte. Erst nach 5-tägiger Applikation von SC-58236 erfolgte bei allen Stimuli eine deutliche Verminderung der Reninaktivität. Betrachtet man jedoch die relativen Anstiege der Renin-mRNA-Abundanz bzw. der PRA, konnte kein Unterschied zwischen den mit Placebo oder SC-58236 behandelten Ratten gefunden werden. Diese Befunde zeigen, dass die Hemmung der COX-2 über die Verminderung der basalen Expression und Sekretion von Renin die Stimulierbarkeit des Renin-Systems als

Antwort auf verschiedene Modulatoren senkt. Es erscheint deshalb unwahrscheinlich, dass COX-2-gebildete Prostaglandine in den Signalweg dieser stimulatorischen Mechanismen per se involviert sind. Auch die Beteiligung COX-1-gebildeter Prostaglandine an der Regulation des Renin-Systems kann mit den hier vorliegenden Daten weitgehend ausgeschlossen werden.

8 Literaturverzeichnis

1. **Azuma J, Sawamura A, Harada H, Awata N, Kishimoto S, and Sperelakis N.** Mechanism of direct cardiostimulating actions of hydralazine. *Eur J Pharmacol* 135: 137-144, 1987.
2. **Bacher S, Kraupp O, Beck A, Seitelberger R, and Raberger G.** Blood pressure response and renin release following 4 days of treatment with dihydralazine and urapidil in conscious dogs. *Cardiovasc Res* 18: 67-74, 1984.
3. **Bacher S, Kraupp O, Beck A, Skoda H, and Raberger G.** Characterization of vasodilators by comparison of their effects on blood pressure, counterregulation and myocardial oxygen demand in conscious normotensive dogs. *Arzneimittelforschung* 35: 288-291, 1985.
4. **Barajas L.** Anatomy of the juxtaglomerular apparatus. *Am J Physiol* 236, 1979.
5. **Beierwaltes W.** Macula densa stimulation of renin is reserved by selective inhibition of neuronal nitric oxide synthase. *Am J Physiol* 272: R1359-1364, 1997.
6. **Bell PD, Lapointe JY, Sabirov R, Peti-Peterdi J, Manabe K, Kovacs G, and Okada Y.** Macula densa cell signaling involves ATP release through a maxi anion channel. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(7): 4322-4327, 2003.
7. **Blum M, Algueti A, Bauminger S, Aviram A, and Ayalon D.** Effect of antihypertensive drugs on plasma renin activity and urinary excretion of prostaglandin E2. *Prostaglandins Med* 7: 261-266, 1981.
8. **Bonvalet JP, Pradelles P, and Farman N.** Segmental synthesis and actions of prostaglandins along the nephron. *Am J Physiol* 253: F377-387, 1987.
9. **Bosse HM, Bohm R, Resch S, and Bachmann S.** Parallel regulation of constitutive NO synthase and renin at JGA of rat kidney under various stimuli. *Am J Physiol* 269: F793-805, 1995.
10. **Breder CD, Dewitt D, and Kraig RP.** Characterization of inducible cyclooxygenase in rat brain. *J Comp Neurol* 355: 296-315, 1995.
11. **Brunton LL, Lazo JS, and Parker KL.** Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, 2005, p. 791-793.

12. **Campbell WB, Graham RM, and Jackson EK.** Inhibition of hydralazine-induced renin release by indomethacin in the rat. *Arch Int Pharmacodyn Ther* 246: 315-323, 1980.
13. **Campbell WB, Graham RM, Jackson EK, Loisel DP, and Pettinger WA.** Effect of indomethacin on hydralazine-induced renin and catecholamine release in the conscious rabbit. *Br J Pharmacol* 71: 529-531, 1980.
14. **Carey RM, McGrath HE, Pentz ES, Gomez RA, and Barrett PQ.** Biomechanical coupling in renin-releasing cells. *J Clin Invest* 100, 1997.
15. **Castrop H, Kammerl M, Mann B, Jensen BL, Krämer BK, and Kurtz A.** Cyclooxygenase 2 and neuronal nitric oxide synthase expression in the renal cortex are not interdependent in states of salt deficiency. *Pflugers Arch* 441: 235-240, 2000.
16. **Castrop H, Klar J, Wagner C, Höcherl K, and Kurtz A.** General inhibition of renocortical cyclooxygenase-2 expression by the renin-angiotensin system. *Am J Physiol Renal Physiol* 284: F518-524, 2003.
17. **Castrop H, Schweda F, Mizel D, Huang Y, Briggs J, Kurtz A, and Schnermann J.** Permissive role of nitric oxide in macula densa control of renin secretion. *Am J Physiol Renal Physiol* 286: F848-857, 2004.
18. **Castrop H, Schweda F, Schumacher K, Wolf K, and Kurtz A.** Role of renocortical cyclooxygenase-2 for renal vascular resistance and macula densa control of renin secretion. *J Am Soc Nephrol* 12: 867-874, 2001.
19. **Castrop H, Vitzthum H, Schumacher K, Schweda F, and Kurtz A.** Low tonicity mediates a downregulation of cyclooxygenase-1 expression by furosemide in the rat renal papilla. *J Am Soc Nephrol* 13: 1136-1144, 2002.
20. **Catanzaro DF, Mullins JJ, and Morris BJ.** The biosynthetic pathway of renin in mouse submaxillary gland. *J Biol Chem* 28, 1983.
21. **Chen M, Schnermann J, Malvin RL, Killen PD, and Briggs JP.** Time course of stimulation of renal renin messenger RNA by furosemide. *Hypertension* 21: 36-41, 1993.
22. **Cheng HF, Wang JL, Zhang MZ, McKanna JA, and Harris RC.** Nitric oxide regulates renal cortical cyclooxygenase-2 expression. *Am J Physiol Renal Physiol* 279: F122-129, 2000.
23. **Cheng HF, Wang JL, Zhang MZ, McKanna JA, and Harris RC.** Role of p38 in the regulation of renal cortical cyclooxygenase-2 expression by extracellular chloride. *J Clin Invest* 106: 681-688, 2000.

24. **Cheng HF, Wang JL, Zhang MZ, Miyazaki Y, Ichikawa I, McKanna JA, and Harris RC.** Angiotensin II attenuates renal cortical cyclooxygenase-2 expression. *J Clin Invest* 103: 953-961, 1999.
25. **Cheng HF, Wang JL, Zhang MZ, Wang SW, McKanna JA, and Harris RC.** Genetic deletion of COX-2 prevents increased renin expression in response to ACE inhibition. *Am J Physiol Renal Physiol* 280: F449-456, 2001.
26. **Cheng HF, Wang SW, Zhang MZ, McKanna JA, Breyer R, and Harris RC.** Prostaglandins that increase renin production in response to ACE inhibition are not derived from cyclooxygenase-1. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 283: R638-646, 2002.
27. **Chomczynski P and Sacchi N.** Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analyt Biochem* 162: 793-799, 1987.
28. **Clark AF, Sharp MGF, Morley SD, Fleming S, Peters J, and Mullins JJ.** Renin-1 is essential for normal renal juxtaglomerular cell granulation and macula densa morphology. *J Biol Chem* 272: 18185-18190, 1997.
29. **Danser AH and Schalekamp MA.** Is there an internal cardiac renin-angiotensin system? *Heart* 76(3 Suppl 3): 28-32, 1996.
30. **Delbridge LM, Morgan TO, and Harris PJ.** Effects of endothelin-1 on the contractility of cardiomyocytes from the spontan hypertensive rat. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 22: 755-762, 1995.
31. **DeWitt DL and Smith WL.** Primary structure of prostaglandin G/H synthase from sheep vesicular gland determined from the complementary DNA sequence. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85: 1412-1416, 1988.
32. **Dinchuk JE, Car BD, Focht RJ, Johnston JJ, Jaffee BD, Covington MB, Contel NR, Eng VM, Collins RJ, Czerniak PM, and et al.** Renal abnormalities and an altered inflammatory response in mice lacking cyclooxygenase II. *Nature* 378: 406-409, 1995.
33. **Dzau VJ.** Local expression and pathophysiological role of renin-angiotensin in the blood vessels and heart. In: *Angiotensin and the Heart.*, edited by Grobecker H, Heusch G and Strauer BE. Darmstadt, Steinkopff: New York, Springer, 1993.
34. **Dzau VJ, Burt DW, and Pratt RE.** Molecular biology of the renin-angiotensin system. *Am J Physiol* 255: F563-573, 1988.
35. **Francisco LL, Osborn JL, and DiBona GF.** Prostaglandin in renin release during sodium deprivation. *Am J Physiol* 243: F537-542, 1982.
36. **Fujino T, Nakagawa N, Yuhki K, Hara A, Yamada T, Takayama K, Kuriyama S, Hosoki Y, Takahata O, Taniguchi T, Fukuzawa J, Hasebe N,**

- Kikuchi K, Narumiya S, and Ushikubi F.** Decreased susceptibility to renovascular hypertension in mice lacking the prostaglandin I2 receptor IP. *J Clin Invest* 114: 805-812, 2004.
37. **Gerber JG, Keller RT, and Nies AS.** Prostaglandins and renin release: the effect of PGI₂, PGE₂, and 13,14-dihydro PGE₂ on the baroreceptor mechanism of renin release in the dog. *Circ Res* 44: 796-799, 1979.
38. **Given BD, Vita NA, Black HR, Francis C, Lasseter K, Morray RL, Mickiewicz C, Akester J, Koury K, and Dzau VJ.** Prostaglandin E2 analogue elicits renal and hormonal compensatory mechanisms in human hypertension. *Hypertension* 8: 489-496, 1986.
39. **Goldblatt MW.** A depressor substance in seminal fluid. *J Soc Chem Ind* 52, 1933.
40. **Greenberg SG, Lorenz JN, He XR, Schnermann JB, and Briggs JP.** Effect of prostaglandin synthesis inhibition on macula densa-stimulated renin secretion. *Am J Physiol* 265: F578-583, 1993.
41. **Gross GJ and Moore J.** Effect of COX-1/COX-2 inhibition versus selective COX-2 inhibition on coronary vasodilator responses to arachidonic acid and acetylcholine. *Pharmacology* 71(3): 135-142, 2004.
42. **Hackenthal E, Paul M, Ganten D, and Taugner R.** Morphology, physiology, and molecular biology of renin secretion. *Physiol Rev* 70: 1067-1116, 1990.
43. **Hajj-Ali AF and Wong PC.** Beta adrenoceptor blockade in rabbit inhibits the renin-releasing effect of AT1 receptor antagonist losartan. *J Pharmacol Exp Ther* 267: 1423-1427, 1993.
44. **Harris RC.** Interactions between COX-2 and the renin-angiotensin system in the kidney. *Acta Physiol Scand* 177: 423-427, 2003.
45. **Harris RC and Breyer MD.** Physiological regulation of cyclooxygenase-2 in the kidney. *Am J Physiol Renal Physiol* 281: F1-11, 2001.
46. **Harris RC, Cheng H, Wang J, Zhang M, and McKanna JA.** Interactions of the renin-angiotensin system and neuronal nitric oxide synthase in regulation of cyclooxygenase-2 in the macula densa. *Acta Physiol Scand* 168: 47-51, 2000.
47. **Harris RC, McKanna JA, Akai Y, Jacobson HR, Dubois RN, and Breyer MD.** Cyclooxygenase-2 is associated with the macula densa of rat kidney and increases with salt restriction. *J Clin Invest* 94: 2504-2510, 1994.
48. **Hartner A, Cordasic N, Goppelt-Struebe M, Veelken R, and Hilgers KF.** Role of macula densa cyclooxygenase-2 in renovascular hypertension. *Am J Physiol Renal Physiol* 284: F498-502, 2003.

49. **He XR, Greenberg SG, Briggs JP, and Schnermann J.** Effects of furosemide and verapamil on the NaCl dependency of macula densa-mediated renin secretion. *Hypertension* 26, 1995.
50. **Henrich WL and Campbell WB.** The systemic beta-adrenergic pathway to renin secretion: relationships with the renal prostaglandin system. *Endocrinology* 113: 2247-2254, 1983.
51. **Hétu PO and Riendeau D.** Cyclo-oxygenase-2 contributes to constitutive prostanoid production in rat kidney and brain. *Biochem J* 391(Pt 3), 2005.
52. **Hippisley-Cox J and Coupland C.** Risk of myocardial infarction in patients taking cyclo-oxygenase-2 inhibitors or conventional non-steroidal antiinflammatory drugs. *BMJ* 330: 1366, 2005.
53. **Hirose S, Kim S, Miyazaki H, Park YS, and Murakami K.** In vitro biosynthesis of human renin and identification of plasma inactive renin as an activation intermediate. *J Biol Chem* 260, 1985.
54. **Höcherl K, Dreher F, Kurtz A, and Bucher M.** Cyclooxygenase-2 inhibition attenuates lipopolysaccharide-induced cardiovascular failure. *Hypertension* 40: 947-953, 2002.
55. **Höcherl K, Dreher F, Vitzthum H, Köhler J, and Kurtz A.** Cyclosporine A suppresses cyclooxygenase-2 expression in the rat kidney. *J Am Soc Nephrol* 13: 2427-2436, 2002.
56. **Höcherl K, Endemann D, Kammerl MC, Grobecker HF, and Kurtz A.** Cyclo-oxygenase-2 inhibition increases blood pressure in rats. *Br J Pharmacol* 136: 1117-1126, 2002.
57. **Höcherl K, Hensel C, Ulbricht B, and Krämer BK.** Everolimus treatment downregulates renocortical cyclooxygenase-2 expression in the rat kidney. *Br J Pharmacol* 145: 1112-1122, 2005.
58. **Höcherl K, Kammerl M, Kees F, Krämer BK, Grobecker HF, and Kurtz A.** Role of renal nerves in stimulation of renin, COX-2, and nNOS in rat renal cortex during salt deficiency. *Am J Physiol Renal Physiol* 282: F478-484, 2002.
59. **Höcherl K, Kammerl MC, Schumacher K, Endemann D, Grobecker HF, and Kurtz A.** Role of prostanoids in regulation of the renin-angiotensin-aldosterone system by salt intake. *Am J Physiol Renal Physiol* 283: F294-301, 2002.
60. **Höcherl K, Kees F, Krämer BK, and Kurtz A.** Cyclosporine A attenuates the natriuretic action of loop diuretics by inhibition of renal COX-2 expression. *Kidney Int* 65: 2071-2080, 2004.

61. **Höcherl K, Wolf K, Castrop H, Ittner KP, Bucher M, Kees F, Grobecker HF, and Kurtz A.** Renocortical expression of renin and of cyclooxygenase-2 in response to angiotensin II AT1 receptor blockade is closely coordinated but not causally linked. *Pflugers Arch* 442: 821-827, 2001.
62. **Holmer S, Rinne B, Eckardt KU, Le Hir M, Schricker K, Kaissling B, Riegger G, and Kurtz A.** Role of renal nerves for the expression of renin in adult rat kidney. *Am J Physiol* 266: F738-745, 1994.
63. **Holmer SR, Kaissling B, Putnik K, Pfeifer M, Krämer BK, Riegger GA, and Kurtz A.** Beta-adrenergic stimulation of renin expression in vivo. *J Hypertens* 15: 1471-1479, 1997.
64. **Hurrell DG, Perreault CL, Miao L, Ransil BJ, and Morgan JP.** Cellular mechanism of the positive inotropic effect of hydralazine in mammalian myocardium. *Br J Pharmacol* 109: 667-672, 1993.
65. **Ichitani Y, Holmberg K, Maunsbach AB, Haeggstrom JZ, Samuelsson B, De Witt D, and Hokfelt T.** Cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 expression in rat kidney and adrenal gland after stimulation with systemic lipopolysaccharide: in situ hybridization and immunocytochemical studies. *Cell Tissue Res* 303: 235-252, 2001.
66. **Ikeda K, Nara Y, Horie R, and Yamori Y.** Blood pressure by a new tail cuff method in spontaneously hypertensive rats (SHR). *Jpn Heart J* 29: 548, 1988.
67. **Imig JD.** Eicosanoid regulation of the renal vasculature. *Am J Physiol Renal Physiol* 279: F965-981, 2000.
68. **Jensen BL, Schmid C, and Kurtz A.** Prostaglandins stimulate renin secretion and renin mRNA in mouse renal juxtaglomerular cells. *Am J Physiol* 271: F659-669, 1996.
69. **Jindra A, Jr., Entlicher G, Sosna B, and Horky K.** Subcellular distribution of differently glycosylated forms of active and inactive renin in rat kidney: effect of sodium depletion and captopril treatment. *Endocr Regul* 26: 175-181, 1992.
70. **Kammerl MC, Nusing RM, Seyberth HW, Riegger GA, Kurtz A, and Krämer BK.** Inhibition of cyclooxygenase-2 attenuates urinary prostanoid excretion without affecting renal renin expression. *Pflugers Arch* 442: 842-847, 2001.
71. **Keeton TK and Campbell WB.** The effects of altered sodium balance and adrenergic blockade on renin release induced in rats by angiotensin antagonism. *Circ Res* 38: 531-539, 1976.
72. **Khan KN, Paulson SK, Verburg KM, Lefkowitz JB, and Maziasz TJ.** Pharmacology of cyclooxygenase-2 inhibition in the kidney. *Kidney Int* 61: 1210-1219, 2002.

73. **Kim SM, Chen L, Mizel D, Huang YG, Briggs JP, and Schnermann J.** Low plasma renin and reduced renin secretory responses to acute stimuli in conscious COX-2-deficient mice. *Am J Physiol Renal Physiol* 292: F415-422, 2007.
74. **Komers R, Lindsley JN, Oyama TT, Schutzer WE, Reed JF, Mader SL, and Anderson S.** Immunohistochemical and functional correlations of renal cyclooxygenase-2 in experimental diabetes. *J Clin Invest* 107: 889-898, 2001.
75. **Komhoff M, Jeck ND, Seyberth HW, Grone HJ, Nusing RM, and Breyer MD.** Cyclooxygenase-2 expression is associated with the renal macula densa of patients with Bartter-like syndrome. *Kidney Int* 58: 2420-2424, 2000.
76. **Kopp U and DiBona GF.** Interaction of renal beta 1-adrenoceptors and prostaglandins in reflex renin release. *Am J Physiol* 244: F418-424, 1983.
77. **Krämer BK, Kammerl MC, and Komhoff M.** Renal cyclooxygenase-2 (COX-2). Physiological, pathophysiological, and clinical implications. *Kidney Blood Press Res* 27: 43-62, 2004.
78. **Krämer BK, Ritthaler T, Schweda F, Kees F, Schricker K, Holmer SR, and Kurtz A.** Effects of hypoxia on renin secretion and renal renin gene expression. *Kidney Int Suppl* 67: S155-158, 1998.
79. **Kujubu DA, Fletcher BS, Varnum BC, Lim RW, and Herschman HR.** TIS10, a phorbol ester tumor promoter-inducible mRNA from Swiss 3T3 cells, encodes a novel prostaglandin synthase/cyclooxygenase homologue. *J Biol Chem* 266: 12866-12872, 1991.
80. **Kurtz A and Penner R.** Angiotensin II induces oscillations of intracellular calcium and blocks anomalous inward rectifying potassium current in mouse renal juxtaglomerular cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86, 1989.
81. **Kurtz A and Wagner C.** Regulation of renin secretion by angiotensin II-AT1 receptors. *J Am Soc Nephrol* 10 Suppl 11: S162-168, 1999.
82. **Kurtz A and Wagner C.** Role of nitric oxide in the control of renin secretion. *Am J Physiol* 275: F849-862, 1998.
83. **Kurumbail RG, Stevens AM, Gierse JK, McDonald JJ, Stegeman RA, Pak JY, Gildehaus D, Miyashiro JM, Penning TD, Seibert K, Isakson PC, and Stallings WC.** Structural basis for selective inhibition of cyclooxygenase-2 by anti-inflammatory agents. *Nature* 384: 644-648, 1996.
84. **Laemmli UK.** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685, 1970.
85. **Lammintausta R.** The renin-aldosterone system in dihydralazine therapy during hypertensive pregnancy. *Int J Clin Pharmacol Biopharm* 16: 581-584, 1978.

86. **Langenbach R, Morham SG, Tiano HF, Loftin CD, Ghanayem BI, Chulada PC, Mahler JF, Lee CA, Goulding EH, Kluckman KD, Kim HS, and Smithies O.** Prostaglandin synthase 1 gene disruption in mice reduces arachidonic acid-induced inflammation and indomethacin-induced gastric ulceration. *Cell* 83: 483-492, 1995.
87. **Linas SL.** Role of prostaglandins in renin secretion in the isolated kidney. *Am J Physiol* 246(6 Pt 2): F811-818, 1984.
88. **Lopez-Parra M, Claria J, Planaguma A, Titos E, Masferrer JL, Woerner BM, Koki AT, Jimenez W, Altuna R, Arroyo V, Rivera F, and Rodes J.** Cyclooxygenase-1 derived prostaglandins are involved in the maintenance of renal function in rats with cirrhosis and ascites. *Br J Pharmacol* 135: 891-900, 2002.
89. **Lorenz JN, Weihprecht H, Schnermann J, Skott O, and Briggs JP.** Renin release from isolated juxtaglomerular apparatus depends on macula densa chloride transport. *Am J Physiol* 260: F486-493, 1991.
90. **Luong C, Miller A, Barnett J, Chow J, Ramesha C, and Browner MF.** Flexibility of the NSAID binding site in the structure of human cyclooxygenase-2. *Nat Struct Biol* 3: 927-933, 1996.
91. **Mann B, Hartner A, Jensen BL, Hilgers KF, Höcherl K, Krämer BK, and Kurtz A.** Acute upregulation of COX-2 by renal artery stenosis. *Am J Physiol Renal Physiol* 280: F119-125, 2001.
92. **Mann B, Hartner A, Jensen BL, Kammerl M, Krämer BK, and Kurtz A.** Furosemide stimulates macula densa cyclooxygenase-2 expression in rats. *Kidney Int* 59: 62-68, 2001.
93. **Matsumura Y, Hisaki K, Ohyama T, Hayashi K, and Morimoto S.** Effects of endothelin on renal function and renin secretion in anesthetized rats. *Eur J Pharmacol* 166: 577-580, 1989.
94. **McAdam BF, Catella-Lawson F, Mardini IA, Kapoor S, Lawson JA, and FitzGerald GA.** Systemic biosynthesis of prostacyclin by cyclooxygenase (COX)-2: the human pharmacology of a selective inhibitor of COX-2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 272-277, 1999.
95. **Morham SG, Langenbach R, Loftin CD, Tiano HF, Vouloumanos N, Jennette JC, Mahler JF, Kluckman KD, Ledford A, Lee CA, and Smithies O.** Prostaglandin synthase 2 gene disruption causes severe renal pathology in the mouse. *Cell* 83: 473-482, 1995.
96. **Morris BJ.** Molecular biology of renin I: gene and protein structure, synthesis and processing. *J Hypertens* 10: 209-214, 1992.

97. **Morris BJ.** Molecular biology of renin. In: *Molecular reviews in cardiovascular medicine.*, edited by Lindpaintner K and Ganten D. London: Chapman & Hall, 1996, p. 12-32.
98. **Mundel P, Bachmann S, Bader M, Fischer A, Kummer W, Mayer B, and Kriz W.** Expression of nitric oxide synthase in macula densa cells. *Kidney Int* 42(4): 1017-1019, 1992.
99. **Murakami M, Nakatani Y, Tanioka T, and Kudo I.** Prostaglandin E synthase. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 68-69: 383-399, 2002.
100. **Muscara MN, Vergnolle N, Lovren F, Triggle CR, Elliott SN, Asfaha S, and Wallace JL.** Selective cyclo-oxygenase-2 inhibition with celecoxib elevates blood pressure and promotes leukocyte adherence. *Br J Pharmacol* 129: 1423-1430, 2000.
101. **Norwood VF, Morham SG, and Smithies O.** Postnatal development and progression of renal dysplasia in cyclooxygenase-2 null mice. *Kidney Int* 58: 2291-2300, 2000.
102. **Ogawa K, Yamasato M, and Taniguchi K.** Exocytosis of secretory granules in the juxtaglomerular granular cells of kidneys. *Anat Rec* 243: 336-346, 1995.
103. **Park CS, Chang SH, Lee HS, Kim SH, Chang JW, and Hong CD.** Inhibition of renin secretion by Ca²⁺ through activation of myosin light chain kinase. *Am J Physiol* 271: C242-247, 1996.
104. **Patrignani P, Panara MR, Sciulli MG, Santini G, Renda G, and Patrono C.** Differential inhibition of human prostaglandin endoperoxide synthase-1 and -2 by nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *J Physiol Pharmacol* 48: 623-631, 1997.
105. **Paulson SK, Zhang JY, Breau AP, Hribar JD, Liu NW, Jessen SM, Lawal YM, Cogburn JN, Gresk CJ, Markos CS, Maziasz TJ, Schoenhard GL, and Burton EG.** Pharmacokinetics, tissue distribution, metabolism, and excretion of celecoxib in rats. *Drug Metab Dispos* 28: 514-521, 2000.
106. **Penning TD, Talley JJ, Bertenshaw SR, Carter JS, Collins PW, Doctor S, Graneto MJ, Lee LF, Malecha JW, Miyashiro JM, Rogers RS, Rogier DJ, Yu SS, Anderson GD, Burton EG, Cogburn JN, Gregory SA, Koboldt CM, Perkins WE, Seibert K, Veenhuizen AW, Zhang YY, and Isakson PC.** Synthesis and Biological Evaluation of the 1,5-Diarylpyrazole Class of Cyclooxygenase-2 Inhibitors: Identification of 4-(5-(4-Methylphenyl)-3-(trifluoromethyl)-1H-pyrazol-1-yl)benzenesulfonamide (SC58635, Celecoxib). *J Med Chem* 40: 1347-1365, 1997.
107. **Persson AEG, Ollerstam A, Liu R, and Brown R.** Mechanisms for macula densa cell release of renin. *Acta Physiol Scand* 181: 471-474, 2004.

108. **Peti-Peterdi J, Komlosi P, Fuson AL, Guan Y, Schneider A, Qi Z, Redha R, Rosivall L, Breyer MD, and Bell PD.** Luminal NaCl delivery regulates basolateral PGE2 release from macula densa cells. *J Clin Invest* 112: 76-82, 2003.
109. **Pfeilschifter J, Kurtz A, and Bauer C.** Inhibition of renin release by platelet activating factor in cultured rat juxtaglomerular cells. *Biochem Biophys Res Commun* 127: 903-910, 1985.
110. **Phillips MI, Speakman EA, and Kimura B.** Levels of angiotensin and molecular biology of the tissue renin angiotensin systems. *Regul Pept* 43: 1-20, 1993.
111. **Reimann IW, Ratge D, Wisser H, and Frolich JC.** Influence of prostaglandin inhibition on dihydralazine induced acute effects in patients with essential hypertension. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 12: 79-89, 1985.
112. **Richter CM, Godes M, Wagner C, Maser-Gluth C, Herzfeld S, Dorn M, Priem F, Slowinski T, Bauer C, Schneider W, Neumayer HH, Kurtz A, and Hocher B.** Chronic cyclooxygenase-2 inhibition does not alter blood pressure and kidney function in renovascular hypertensive rats. *J Hypertens* 22: 191-198, 2004.
113. **Ristimaki A, Narko K, and Hla T.** Down-regulation of cytokine-induced cyclo-oxygenase-2 transcript isoforms by dexamethasone: evidence for post-transcriptional regulation. *Biochem J* 318 (Pt 1): 325-331, 1996.
114. **Ritthaler T, DellaBruna R, Krämer BK, and Kurtz A.** Endothelins inhibit cyclic-AMP induced renin gene expression in cultures mouse juxtaglomerular cells. *Kidney Int* 50: 108-115, 1996.
115. **Rodriguez F, Llinas MT, Gonzalez JD, Rivera J, and Salazar FJ.** Renal changes induced by a cyclooxygenase-2 inhibitor during normal and low sodium intake. *Hypertension* 36: 276-281, 2000.
116. **Roig F, Llinas MT, Lopez R, and Salazar FJ.** Role of cyclooxygenase-2 in the prolonged regulation of renal function. *Hypertension* 40: 721-728, 2002.
117. **Roman RJ and Lianos E.** Influence of prostaglandins on papillary blood flow and pressure-natriuretic response. *Hypertension* 15: 29-35, 1990.
118. **Rossat J, Maillard M, Nussberger J, Brunner HR, and Burnier M.** Renal effects of selective cyclooxygenase-2 inhibition in normotensive salt-depleted subjects. *Clin Pharmacol Ther* 66: 76-84, 1999.
119. **Saavedra JM.** Brain and pituitary angiotensin. *Endocr Rev* 13: 329-380, 1992.

120. **Sadoshima J and Izumo S.** Molecular characterization of angiotensin II-induced hypertrophy of cardiac myocytes and hyperplasia of cardiac fibroblasts. *Circ Res* 83: 13-25, 1993.
121. **Saini SS, Gessell-Lee DL, and Peterson JW.** The cox-2-specific inhibitor celecoxib inhibits adenylyl cyclase. *Inflammation* 27: 79-88, 2003.
122. **Schlatter E, Salomonsson M, Persson AEG, and Greger R.** Macula densa cells sense luminal NaCl concentration via furosemide sensitive Na⁺, K⁺, 2Cl⁻ cotransport. *Pflügers Arch* 414: 286-290, 1989.
123. **Schlondorff D.** Renal complications of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Kidney Int* 44: 643-653, 1993.
124. **Scholz H, Hamann M, Goetz KH, and Kurtz A.** Role of calcium ions in the pressure control of renin secretion from the kidneys. *Pflügers Arch* 428: 173-178, 1994.
125. **Schramek H, Coroneos E, and Dunn MJ.** Interactions of the vasoconstrictor peptides, angiotensin II and endothelin-1, with vasodilatory prostaglandins. *Semin Nephrol* 15: 195-204, 1995.
126. **Schricker K and Kurtz A.** Blockade of nitric oxide formation inhibits the stimulation of the renin system by a low salt intake. *Pflügers Arch* 432: 187-191, 1996.
127. **Schuster VL.** Prostaglandin transport. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 68-69: 633-647, 2002.
128. **Schweda F, Klar J, Narumiya S, Nusing RM, and Kurtz A.** Stimulation of renin release by prostaglandin E2 is mediated by EP2 and EP4 receptors in mouse kidneys. *Am J Physiol Renal Physiol* 287: F427-433, 2004.
129. **Schweda F, Wagner C, Krämer BK, Schnermann J, and Kurtz A.** Preserved macula densa-dependent renin secretion in A1 adenosine receptor knockout mice. *Am J Physiol Renal Physiol* 284: F770-777, 2003.
130. **Shricker K, Holmer S, Krämer BK, Riegger GA, and Kurtz A.** The role of angiotensin II in the feedback control of renin gene expression. *Pflügers Arch* 434: 166-172, 1997.
131. **Simmons DL, Botting RM, and Hla T.** Cyclooxygenase isozymes: the biology of prostaglandin synthesis and inhibition. *Pharmacol Rev* 56: 387-437, 2004.
132. **Singh G, Mithal A, and Triadafilopoulos G.** Both selective cox-2 inhibitors and non selective NSAIDs increase the risk of acute myocardial infarction in patients with arthritis: selectivity is with the patient, not the drug class. *Annals Rheum Dis* 63(Suppl III): 85, 2005.

133. **Skott O.** Do osmotic forces play a role in renin secretion? *Am J Physiol* 255: 1-10, 1988.
134. **Skott O.** Episodic release of renin from single isolated superfused rat afferent arterioles. *Pflügers Arch* 407: 41-45, 1986.
135. **Smith WL.** Prostanoid biosynthesis and mechanisms of action. *Am J Physiol* 263: F181-191, 1992.
136. **Smith WL, DeWitt DL, and Garavito RM.** Cyclooxygenases: structural, cellular, and molecular biology. *Annu Rev Biochem* 69: 145-182, 2000.
137. **Suzuki S, Franco-Saenz R, Tan SY, and Mulrow PJ.** Effects of indomethacin on plasma renin activity in the conscious rat. *Am J Physiol* 240: E286-289, 1981.
138. **Taugner R, Buhle CP, Hackenthal E, Mannek E, and Nobiling R.** Morphology of the juxtaglomerular apparatus. *Contr Nephrol* 43: 76-101, 1984.
139. **Tegeder I, Neupert W, Guhring H, and Geisslinger G.** Effects of selective and unselective cyclooxygenase inhibitors on prostanoid release from various rat organs. *J Pharmacol Exp Ther* 292: 1161-1168, 2000.
140. **Thomson S, Bao D, Deng A, and Vallon V.** Adenosine formed by 5'-nucleotidase mediates tubuloglomerular feedback. *J Clin Invest* 106: 289-298, 2000.
141. **Traynor TR, Smart A, Briggs JP, and Schnermann J.** Inhibition of macula densa-stimulated renin secretion by pharmacological blockade of cyclooxygenase-2. *Am J Physiol* 277: F706-710, 1999.
142. **Vane JR.** Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for aspirin-like drugs. *Nat New Biol* 231: 232-235, 1971.
143. **Vane JR.** Towards a better aspirin. *Nature* 367: 215-216, 1994.
144. **Villa E, Garcia-Robles R, Haas J, and Romero JC.** Comparative effect of PGE2 and PGI2 on renal function. *Hypertension* 30: 664-666, 1997.
145. **Villarreal D, Davis JO, Freeman RH, Sweet WD, and Dietz JR.** Effects of meclofenamate on the renin response to aortic constriction in the rat. *Am J Physiol* 247: R546-551, 1984.
146. **Vitzthum H, Abt I, Einhellig S, and Kurtz A.** Gene expression of prostanoid forming enzymes along the rat nephron. *Kidney Int* 62: 1570-1581, 2002.
147. **von Euler US.** The specific blood pressure lowering substance in human prostate and seminal vesicle secretions. *Klin Wochenschr* 14, 1935.

148. **Wagner C, Godecke A, Ford M, Schnermann J, Schrader J, and Kurtz A.** Regulation of renin gene expression in kidneys of eNOS- and nNOS-deficient mice. *Pflugers Arch* 439: 567-572, 2000.
149. **Wagner C and Kurtz A.** Effects of candesartan on the renin system in conscious rats. *J Am Soc Nephrol* 10 Suppl 11: S169-171, 1999.
150. **Wallace JL, McKnight W, Reuter BK, and Vergnolle N.** NSAID-induced gastric damage in rats: requirement for inhibition of both cyclooxygenase 1 and 2. *Gastroenterology* 119(3): 706-714, 2000.
151. **Wang JL, Cheng HF, and Harris RC.** Cyclooxygenase-2 inhibition decreases renin content and lowers blood pressure in a model of renovascular hypertension. *Hypertension* 34: 96-101, 1999.
152. **Wilcox CS, Welch WJ, Murad F, Gross SS, Taylor G, Levi R, and Schmidt HH.** Nitric oxide synthase in macula densa regulates glomerular capillary pressure. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89(24): 11993-11997, 1992.
153. **Xie WL, Chipman JG, Robertson DL, Erikson RL, and Simmons DL.** Expression of a mitogen-responsive gene encoding prostaglandin synthase is regulated by mRNA splicing. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88: 2692-2696, 1991.
154. **Yamazaki T, Komuro I, Kudoh S, Zou Y, Shiojima I, Mizno T, Takano H, Hiroi Y, Ueki K, and Tobe K.** Angiotensin II partly mediates mechanical stress-induced cardiac hypertrophy. *Circ Res* 77: 258-265, 1995.
155. **Yang T, Endo Y, Huang YG, Smart A, Briggs JP, and Schnermann J.** Renin expression in COX-2-knockout mice on normal or low-salt diets. *Am J Physiol Renal Physiol* 279: F819-825, 2000.
156. **Yang T, Huang YG, Ye W, Hansen P, Schnermann JB, and Briggs JP.** Influence of genetic background and gender on hypertension and renal failure in COX-2-deficient mice. *Am J Physiol Renal Physiol* 288: F1125-1132, 2005.
157. **Yang T, Park JM, Arend L, Huang Y, Topaloglu R, Pasumarthy A, Praetorius H, Spring K, Briggs JP, and Schnermann J.** Low chloride stimulation of prostaglandin E2 release and cyclooxygenase-2 expression in a mouse macula densa cell line. *J Biol Chem* 275: 37922-37929, 2000.
158. **Yang T, Singh I, Pham H, Sun D, Smart A, Schnermann JB, and Briggs JP.** Regulation of cyclooxygenase expression in the kidney by dietary salt intake. *Am J Physiol* 274: F481-489, 1998.
159. **Zhang MZ, Hao CM, Breyer MD, Harris RC, and McKanna JA.** Mineralocorticoid regulation of cyclooxygenase-2 expression in rat renal medulla. *Am J Physiol Renal Physiol* 283: F509-516, 2002.

160. **Zhang MZ, Harris RC, and McKanna JA.** Regulation of cyclooxygenase-2 (COX-2) in rat renal cortex by adrenal glucocorticoids and mineralocorticoids. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 15280-15285, 1999.
161. **Zhang MZ, Yao B, McKanna JA, and Harris RC.** Cross talk between the intrarenal dopaminergic and cyclooxygenase-2 systems. *Am J Physiol Renal Physiol* 288: F840-845, 2005.

9 Publikationen

Originalpublikationen:

Matzdorf C, Kurtz A, and Höcherl K. COX-2 activity determines the level of renin expression but is dispensable for acute upregulation of renin expression in rat kidneys. *Am J Physiol Renal Physiol* 292(6): F1782-1790, 2007

Höcherl K, Hensel C, Ulbricht B, and Krämer BK. Everolimus treatment downregulates renocortical cyclooxygenase-2 expression in the rat kidney. *Br J Pharmacol* 125: 1112-1122, 2005

Abstracts:

Matzdorf C, Kurtz A, and Höcherl K. Effect of the COX-2 inhibitor SC-58236 on renin secretion and renin synthesis in the rat. *Nieren- und Hochdruckkrankheiten* 36 (9): 449, GfN 2007

Höcherl K, Matzdorf C, and Kurtz A. Effect of the COX-2 inhibitor SC-58236 on renin secretion and renin synthesis in the rat. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 375 (Suppl 1): 48, 209, DGPT 2007

Hensel C, and Höcherl K. Angiotensin II induces cyclooxygenase-2 expression in rat mesangial cells. via p38 MAPK. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 372 (Suppl 1): 44, 131, DGPT 2006

Höcherl K, Hensel C, and Krämer BK. Everolimus treatment downregulates renocortical cyclooxygenase-2 expression in the rat kidney. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 372 (Suppl 1): 45, 135, DGPT 2006

Höcherl K, and Hensel C. Angiotensin II induces cyclooxygenase-2 expression in rat mesangial cells via p38 MAPK. *J Am Soc Nephrol* 16: 605A, SAPO213, ASN 2005

10 Anhang

Lebenslauf

Name

Corina Matzdorf, geb. Hensel

persönliche Daten

geboren am 16.04.1979,

Apothekerin

Beruflicher Werdegang

02/2004 - heute Institut für Pharmazie, Universität Regensburg, Doktorandin

01/2004 3. Abschnitt der pharmazeutischen Prüfung

06/2003 - 01/2004 Institut für Pharmazie, Universität Regensburg,
Pharmaziepraktikantin

11/2002 - 05/2003 Kristinen-Apotheke, Berlin, Pharmaziepraktikantin

Studium

10/2002 Abschluss: 2. Abschnitt der pharmazeutischen Prüfung

10/1998 - 10/2002 Freie Universität Berlin, Studium der Pharmazie

Schulische Ausbildung

11.06.1998 Abitur

09/1991 – 06/1998 Gerhart-Hauptmann-Gymnasium, Berlin

09/1985 – 08/1991 Polytechnische Oberschule Dr.-Arvid-Harnack, Berlin

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe; die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe des Literaturzitats gekennzeichnet.

Weitere Personen waren an der inhaltlich-materiellen Herstellung der vorliegenden Arbeit nicht beteiligt. Insbesondere habe ich hierfür nicht die entgeltliche Hilfe eines Promotionsberaters oder anderer Personen in Anspruch genommen. Niemand hat von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen.

Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Regensburg, den _____

Corina Matzdorf