

Aus dem Fachbereich Medizin der
Johann Wolfgang Goethe-Universität
Institut für Klinische Pharmakologie

DIE WIRKUNG VON CYCLOOXYGENASE-2-INHIBITOREN
AUF DIE NEPHROGENESE VON MÄUSEN

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin des
Fachbereiches Medizin der Johann Wolfgang Goethe-Universität
Frankfurt am Main

vorgelegt von

Anke Olliges

aus Stuttgart-Bad Cannstatt

Frankfurt am Main, 2009

Dekan: Professor Dr. Josef Pfeilschifter

Referent: Professor Dr. Rolf Michael Nüsing

Koreferent: Professor Dr. Helmut Geiger

Datum der mündlichen Prüfung: 11. März 2010

Für alle Labortiere

“It is sometimes said that the major discoveries have already been made and that there is nothing important left to find. This attitude is altogether too pessimistic. There are plenty of ideas and plenty of things left to discover. The trick is to find the right path from one to the other.”

John R. Vane (1927-2004), from Banquet Speech, The Nobel Prize of Physiology or Medicine 1982

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Die Prostaglandine und der Prostaglandinstoffwechsel	1
1.1.1	Prostaglandine	1
1.1.2	Stoffwechsel der Prostaglandine	1
1.1.3	Die Cyclooxygenase-Inhibitoren	4
1.1.4	Cyclooxygenasen und Prostaglandine in der Niere	7
1.2	Die Nephrogenese	10
1.2.1	Molekulare Regulation der Nephrogenese	11
1.3	Die gestörte Nephrogenese	11
1.3.1	Glucose-Spiegel	11
1.3.2	Utero-plazentare Insuffizienz und Glucocorticoidexcess	14
1.3.3	NSAIDs, COX-2-Inhibitoren und COX-2 ^{-/-} -Mäuse	15
1.3.4	Renin-Angiotensin-System	16
1.4	Glykogen-Synthase-Kinase-3-und Akt-Signalweg	18
1.4.1	Akt-Kinase	18
1.4.2	GSK-3	19
1.4.3	Akt-/GSK-3-Signalwege	20
1.5	Zielsetzung der Arbeit	21
2	Material und Methoden	23
2.1	Material	23
2.1.1	Chemikalien und Reagenzien	23
2.1.2	Prüfsubstanzen	25
2.1.3	Puffer und Lösungen	28
2.1.4	Primer	31
2.1.5	Geräte und Materialien	31
2.1.6	Versuchstiere	33
2.2	Methoden	33

2.2.1	Behandlung der Mäuse	33
2.2.2	Präparation der Mäuse	34
2.2.3	Paraffinschnitte	34
2.2.4	Hämatoxylin-Eosin-Färbung	35
2.2.5	Mikroskopie	35
2.2.6	Genotypisierung der Mäuse	35
2.2.7	DNA-Isolation	35
2.2.8	Qualitative Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	36
2.2.9	Gelelektrophorese	36
2.2.10	RNA-Isolation mit RNeasy Mini Kit für quantitative TaqMan PCR	37
2.2.11	Reverse Transkription	37
2.2.12	TaqMan PCR	38
2.2.13	Proteinpräparation	38
2.2.14	Proteinbestimmung	39
2.2.15	SDS-PAGE-Minigel	40
2.2.16	Western Blot	41
2.3	Statistik	42
3	Ergebnisse	45
3.1	C57/BL6-Maus, unbehandelt versus behandelt mit DMSO	45
3.2	COX-2 ^{-/-} -Mäuse	49
3.3	Selektive COX-2-Inhibitoren	52
3.3.1	SC-236	52
3.3.2	SC-791	55
3.3.3	Celecoxib	58
3.3.4	Etoricoxib	58
3.3.5	Lumiracoxib	64
3.3.6	Rofecoxib	64
3.3.7	Valdecoxib	67
3.4	Klassische NSAIDs	73
3.4.1	Diclofenac	73
3.4.2	Naproxen	73
3.5	Selektiver COX-1-Inhibitor	79
3.5.1	SC-560	79
3.6	DMC: Ein Celecoxib-Derivat, ohne Hemmpotenz für die COX	82
3.6.1	DMC	82

3.7	Zusammenstellung der Ergebnisse aus Abschnitt 3.1 bis 3.6	85
3.8	Kinetik: COX-2-Expression von unbehandelten Tieren	87
3.8.1	Quantitative TaqMan RT-PCR an Tag P2, P4, P6, P8 und P21	87
3.8.2	Western Blot-Analyse an Tag P2, P4, P6, P8 und P21	87
3.9	Kinetik: Behandlung mit SC-236 von Tag P1 bis P6 versus bis P21	88
3.9.1	Zusammenstellung der Ergebnisse	90
3.10	Inhibitoren im Renin-Angiotensin-System	94
3.10.1	ACE-Hemmer: Enalapril	94
3.10.2	Angiotensin II-Rezeptor-Typ 1-Antagonist: Telmisartan	97
3.10.3	Zusammenstellung der Ergebnisse	103
3.11	Inhibitoren im Akt-/GSK-Signalweg	103
3.11.1	GSK-3 β -Inhibitor	103
3.11.2	Akt-Inhibitor: Triciribine	103
3.11.3	Zusammenstellung der Ergebnisse	109
4	Diskussion	111
4.1	Cyclooxygenasen und die Niere	111
4.1.1	Die Wirkung von COX-2-Inhibitoren auf die Nephrogenese	111
4.1.2	Kinetik der COX-2-Expression- Reversibilität der COX-2-Inhibition?	115
4.2	RAAS-Inhibition: Enalapril und Telmisartan	115
4.2.1	ACE-Inhibitor: Enalapril	116
4.2.2	AT1-Antagonist: Telmisartan	118
4.3	Klinische Konsequenzen aus der Studie	119
4.4	Inhibition der GSK-3 β und Akt	121
4.4.1	Akt-Inhibitor: Triciribine	122
4.4.2	GSK-3 β -Inhibitor	122
4.5	Signalwege, Schnittstellen?	123
5	Zusammenfassung	125
6	Abstract	129
References		131
Anhang		143
Danksagung		147
Eidesstattliche Erklärung		149

Kapitel 1

Einleitung

1.1 Die Prostaglandine und der Prostaglandinstoffwechsel

1.1.1 Prostaglandine

Prostaglandine sind kurzlebige Gewebeshormone, die an zahlreichen physiologischen Vorgängen, wie beispielsweise an der Tonusregulation glatter Muskelzellen, Säureregulation im Magen, Schleimhautintegrität des Gastro-Intestinal-Traktes (GIT), Regulation der Natrium- und Wasserretention in der Niere, an der Immunantwort, an der Fortpflanzung, an der Angiogenese und der Organogenese, beteiligt sind. Ebenso sind sie Mediatoren von pathophysiologischen Vorgängen, wie Schmerz-, Fieber- und Entzündungsreaktionen.

Sie sind eine Gruppe von lokal wirkenden Gewebeshormonen, die aus mehrfach ungesättigten Fettsäuren, überwiegend aus der omega-6-C₂₀-Fettsäure Arachidonsäure (AA), abgeleitet werden. Neben den Prostaglandinen werden auch das Thromboxan A₂, Prostacyclin (PGI₂) und die Leukotriene aus den Metaboliten der AA gebildet und zur Gruppe der Eicosanoide zusammengefasst.

1.1.2 Stoffwechsel der Prostaglandine

Die AA wird hauptsächlich durch Phospholipase A₂ aus der Zellmembran freigesetzt. Die Phospholipasen werden durch Aktivierung von Signalkaskaden durch verschiedene extrazelluläre Mediatoren, wie beispielweise Histamin, Bradykinin, Angiotensin, Zytokine wie Interleukine, Interferone und TNF- α , sowie bakterielle Lipopolysaccharide (LPS), reguliert [1].

Durch das Enzym Cyclooxygenase (COX) wird aus der freigesetzten AA das zyklische Zwischenprodukt Prostaglandin G₂ (PGG₂) gebildet. Auch die nachfolgende Peroxidase-Reaktion zu Prostaglandin H₂ (PGH₂) wird durch die COX katalysiert. Aus PGH₂ werden durch verschiedene Prostaglandin-Synthasen die unterschiedlichen aktiven Eicosanoide, Prostaglandin E₂ (PGE₂), Prostaglandin D₂ (PGD₂), Prostaglandin F_{2 α} (PGF_{2 α}), Prostacyclin (PGI₂) und Thromboxan (TXA₂) gebildet [2]. Die

primierte COX-1 findet sich in nahezu allen Geweben. Sie stellt die für physiologische Funktionen benötigten Prostaglandine bereit.

Die Expression der induzierbaren COX-2 steigt beispielsweise bei Schmerz- und Entzündungsprozessen durch Bindung von Transkriptionsfaktoren, wie $\text{NF}\kappa\text{B}$ und CREB, was innerhalb von Stunden einen schnellen Anstieg der COX-2-Expression ermöglicht [9].

Zunächst wurde angenommen, dass die COX-2 nicht an der Regulation von physiologischen Funktionen der Prostaglandine beteiligt ist. Aus diesem Grund wurde die COX-2 vorerst als Target für die antiinflammatorischen Effekte der NSAIDs angesehen und die COX-1 für die unerwünschten, hauptsächlich gastrointestinalen Nebeneffekte [10, 11, 12].

Neuere Studien zeigten allerdings, dass auch die COX-2 in einigen Geweben konstitutiv exprimiert wird, unter anderem in der Macula densa der Niere [13], [14] und daher ebenfalls physiologische Bedeutung hat. Die beiden Isoformen unterscheiden sich zudem noch in der Struktur der Substrat-

Tabelle 1.1: Prostanoid-Rezeptoren und Prostanoid-Effekte [4], [15]. Zusammenfassung aus Daten verschiedener Studien, TP-Rezeptor-Isoformen vom Menschen, alle anderen Rezeptoren von der Maus. \uparrow = Anstieg; \downarrow = Abfall.

Rezeptor	G-Protein	Signalweg	Liganden	Effekte
DP	Gs	cAMP \uparrow	PGD ₂	Vasodilatation, Hemmung der Thrombozytenaggregation, Erschlaffung der glatten Muskulatur von GIT und Uterus
EP 1	?	IP ₃ \uparrow , Ca ²⁺	PGE ₂ , PGF _{2α}	Kontraktion der glatten Muskulatur von Brinchien und GIT
EP 2	Gs	cAMP \uparrow	PGE ₂	Erschlaffung der glatten Muskulatur von Bronchien, GIT und Gefäßen
EP 3	Gi, Gs, Gq	cAMP \downarrow , cAMP \uparrow , IP ₃ \uparrow	PGE ₂	Hemmung der Säuresekretion des Magens, verstärkte Uteruskontraktion in der Schwangerschaft, Hemmung der Lipolyse, Neurotransmitterweiterleitung
EP 4	Gs	cAMP \uparrow , IP ₃ \uparrow	PGE ₂	Vermehrte Schleimsekretion des Magens, Offenhalten des Ductus arteriosus Botalli
FP	Gs	IP ₃ \uparrow	PGF ₂	Uteruskontraktion
IP	Gs, Gq	cAMP \uparrow , IP ₃ \uparrow	PGI ₂	Vasodilatation, Hemmung der Thrombozytenaggregation, Reninfreisetzung in der Niere
TP	Gq, Gi, Gs	IP ₃ \uparrow , cAMP \downarrow , cAMP \uparrow	TXA ₂ , PGD ₂	Thrombozytenaggregation, Vasokonstriktion, Bronchokonstriktion

bindungsstelle für AA, durch Austausch von Isoleucin zu Valin an Position 523 bei der COX-2 wird der Substratbindungskanal weiter, was im Vergleich zur COX-1 zu einer höheren Affinität der COX-2

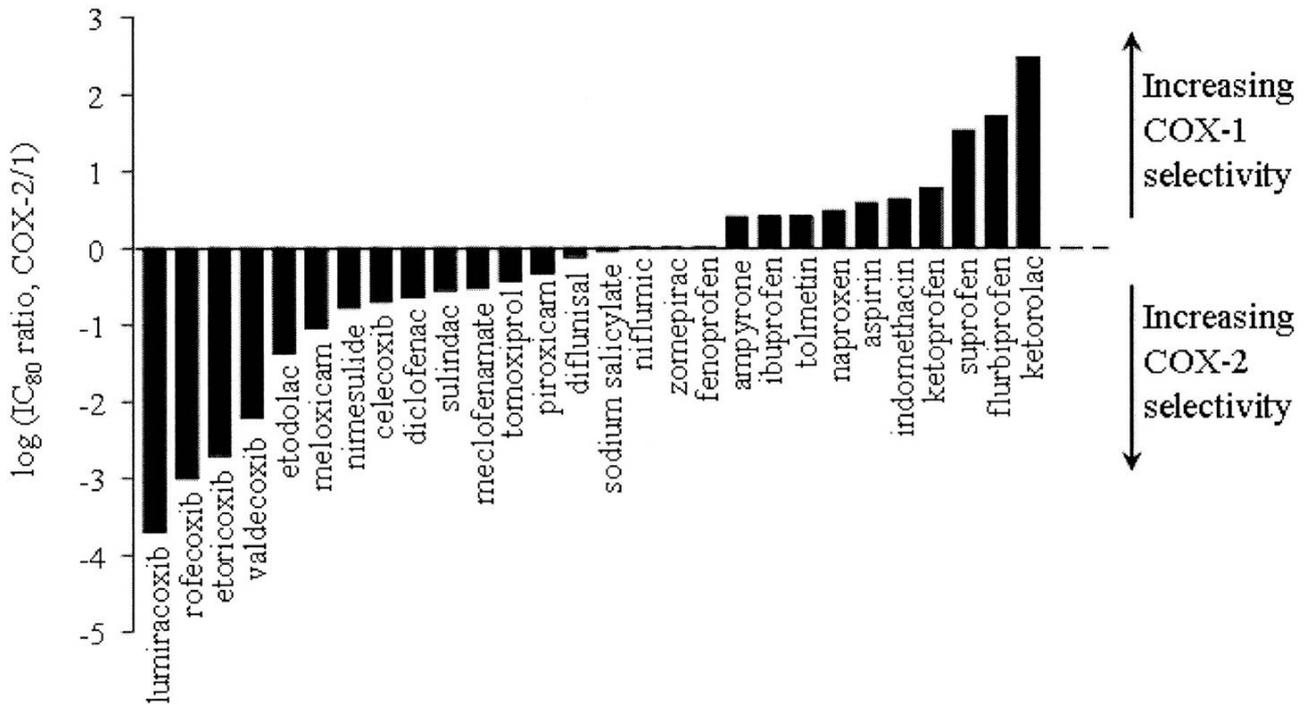


Abbildung 1.2: Relative Selektivität der unterschiedlichen COX-Inhibitoren. Die IC₈₀ Ratio wurde logarithmisch dargestellt, so dass 0 die Linie der äquivalenten Aktivitäten gegen COX-1 und COX-2 darstellt. Nach oben steigt die Selektivität gegen COX-1, nach unten steigt die Selektivität gegen COX-2. Aus [2].

zu AA führt [5]. Die Prostaglandine entfalten ihre Wirkung hauptsächlich über G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCR) in der Zelle, in der sie synthetisiert werden oder in den benachbarten Zellen. Die Tabelle 1.1 gibt einen Überblick über die wichtigsten PG-Rezeptoren, deren Liganden und Beispiele von Wirkungen. Von einigen Rezeptoren sind weitere Subtypen bekannt, allerdings sind deren Signaltransduktionen biochemisch bisher nicht ausreichend geklärt.

1.1.3 Die Cyclooxygenase-Inhibitoren

Nicht-steroidale Antiphlogistika (*non-steroidal antiinflammatory drugs, NSAIDs*) sind Cyclooxygenase-Inhibitoren, die eine antiphlogistische, analgetische und entzündungs-hemmende Wirkung haben. Sie hemmen beide Isoformen der COX mit unterschiedlichen Affinitäten, siehe Abb. 1.2. Die erwünschten und unerwünschten Wirkungen werden hauptsächlich über den Eingriff in die Prostaglandin-Biosynthese erklärt [16], [17]. Klinisch werden sie u.a. bei Fieber, Schmerzen und entzündlichen Erkrankungen eingesetzt, was hauptsächlich über die Hemmung der COX-2- Isoform erreicht wird, wohin gegen die Hemmung der COX-1 die zahlreichen unerwünschten Wirkungen erklärt. In Abb. 1.3 sind die wichtigsten Wirkungen und Angriffsorte der unterschiedlichen COX-Inhibitoren dargestellt. Durch das Wissen über die unterschiedlichen Isoformen der COX und deren Wirkungen wurden Substanzen entwickelt, die selektiv die COX-2-Isoform hemmen. 1996 wurde Meloxicam, als erster COX-2 selektiver Inhibitor in Deutschland zugelassen, allerdings hatte diese Substanz nur eine vergleichbare

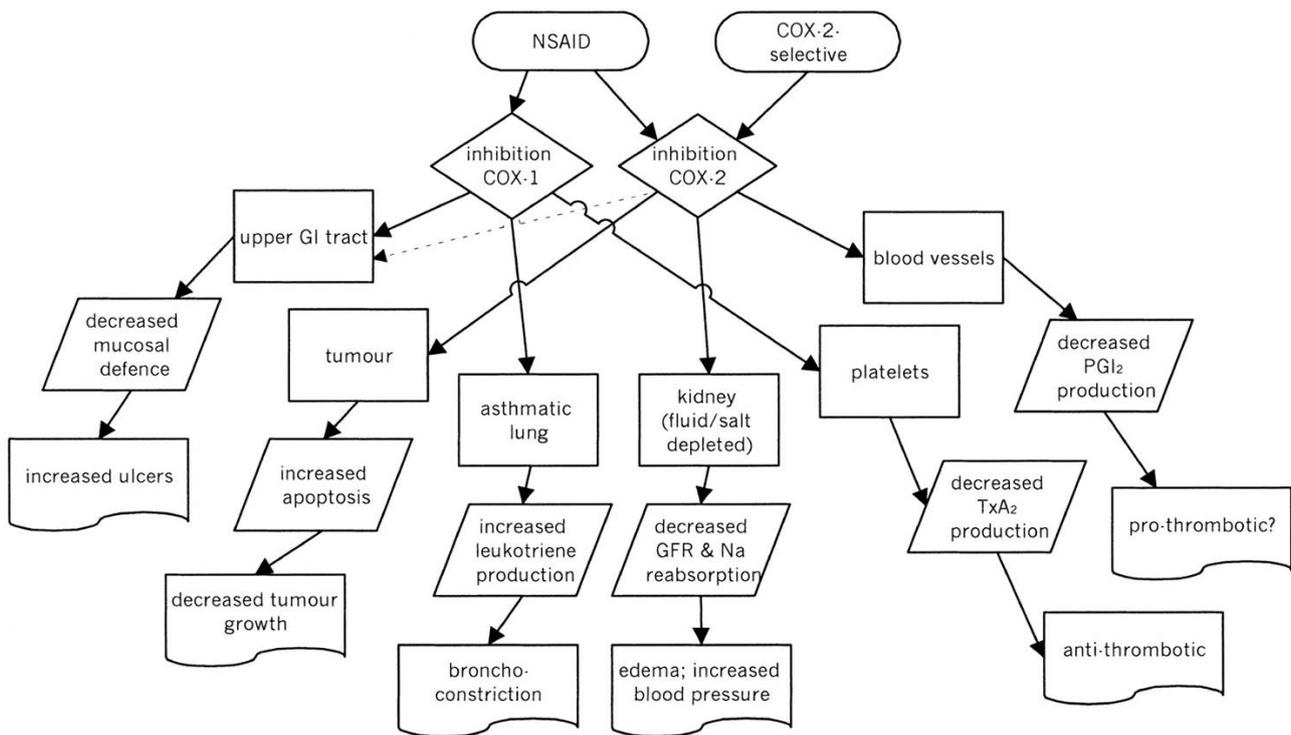


Abbildung 1.3: Überblick über die unterschiedlichen erwünschten und unerwünschten Wirkungen der Inhibitoren der COX-Isoformen. Aus [2].

Hemmpotenz für die COX-2 wie Diclofenac und wird als COX-2- präferentieller COX-Inhibitor beschrieben.

Es folgten die Coxibe, eine Gruppe COX-2 selektiver Substanzen (Tabelle 1.2). Durch die meisten COX-2 selektiven Substanzen konnten die unerwünschten Wirkungen am GIT reduziert werden, allerdings erwiesen sich die selektiven Substanzen nicht als nebenwirkungsfrei. Wie bei den NSAIDs tritt bei Anwendung von Coxiben ebenfalls eine renale Dysfunktion auf (im folgenden Kapitel wird näher darauf eingegangen).

Als Konsequenz der Natrium- und Wasserretention kommt es wahrscheinlich zur Entstehung einer arteriellen Hypertonie als Folge einer Vasokonstriktion der peripheren Widerstandsgefäße [18]. Daraus könnte ein erhöhtes Risiko für kardiovaskulären Ereignisse, wie Myokardinfarkt und apoplektische Insulte resultieren. Dahingegen wird die Thrombozytenfunktion durch Coxibe nicht beeinflusst. Im September 2004 wurde Rofecoxib weltweit von der Herstellerfirma vom Markt genommen, da in unterschiedlichen Studien (APPROVe (*Adenomatous Polyp Prevention on VIOXX Trial*) [23], VIGOR (*VIOXX Gastrointestinal Outcome Research Study*) [24]) beobachtet wurde, dass es unter Rofecoxib zu einem Anstieg des kardiovaskulären Risikos, in Form von beispielsweise Myokardinfarkten, gekommen war. Allerdings zeigte die ADAPT-Studie (*Alzheimer's Disease Anti-inflammatory Prevention Trial* [25]), dass es auch unter Naproxen zur Erhöhung des kardiovaskulären Risikos kam. Im Rahmen der CLASS-Studie (*Celecoxib Long-term Arthritis Safety Study*) wurde für Celecoxib keine Erhöhung des kardiovaskulären Risikos im Vergleich zu Ibuprofen und Diclofenac festgestellt [26]. Unter Behand-

Tabelle 1.2: Pharmakologische und pharmakokinetische Eigenschaften von COX-2-selektiven Inhibitoren. Abk.: FAP: familiäre adenomatöse Polyposis, RA: rheumatoide Arthritis. Substanzen in grauer Schrift sind nicht mehr auf dem Markt: * Valdecoxib wurde im April 2005 vom Markt genommen, ** Rofecoxib wurde im September 2004 vom Markt genommen; *** Die Zulassung für Lumiracoxib ruht seit 2007, # nach Riendeau. [19]-[22]

Substanz (Handelsname)	Celecoxib (Celebrex)	Valdecoxib (Bextra)*	Rofecoxib (VIOXX)**	Etoricoxib (Arcoxia)	Lumiracoxib (Prexige(G))***
Hersteller	Pfizer	Pfizer	Merck	Merck	Novartis
	Sulfonamid	Sulfonamid	Methylsulfon- säure	Methylsulfon- säure	Arylessig- säure
$\frac{IC_{50}COX-1}{IC_{50}COX-2}$ #	7,6	30	35	106	ca. 515
orale Bioverfügbarkeit	40-80%	ca. 80%	ca. 90%	ca. 100%	ca. 100%
Proteinbindung	97%	98%	85%	92%	99%
Halbwertszeit $t_{1/2}$ [h]	8-11	8-11	ca. 17	20-30	3-6
Tagesgesamt-dosis, je nach Indikation [mg]	200-400	10-40	12,5-25	60-120	100-200
Indikationsgebiet	Schmerzen, Arthrose, RA, FAP	Schmerzen, Arthrose, RA	Arthrose, RA, Gicht, Schmerzen	Arthrose, RA, Schmerzen, Gicht	Schmerzen, Arthrose, RA

lung mit Lumiracoxib im Vergleich zu Ibuprofen und Naproxen gab es ebenfalls keine signifikanten Unterschiede bezüglich des kardiovaskulären Risikos im Rahmen der TARGET-Studie (*Therapeutic Arthritis Research and Gastrointestinal Event Trial* [27], [28]). Allerdings ruht in Deutschland seit 2007 die Zulassung aufgrund unerklärter Leberschäden nach Anwendung höherer Dosen (400 mg) für Lumiracoxib. Bei Parecoxib/Valdecoxib kam es zum Anstieg der kardiovaskulären Ereignisse, so dass es nach Empfehlung der europäischen Arzneimittelbehörde (EMA) 2005 von der Herstellerfirma vom Markt genommen wurde (CABG-Studie (*Coronary Arterie Bypass graft trial*) [29]). Etoricoxib wurde Ende 2004 zugelassen. In der MEDAL-Studie (Multinational Etoricoxib and Diclofenac Arthritis Long-Term trial) konnte kein Unterschied zwischen Diclofenac und Etoricoxib bezüglich des kardiovaskulären Risikos festgestellt werden und eine Überlegenheit hinsichtlich der unerwünschten Wirkungen am GIT [30].

Es wird darüber diskutiert, ob es sich um einen Effekt der Coxibe oder der gesamten Gruppe der COX-Inhibitoren handelt. Die entgeltliche Beantwortung der Frage steht noch aus. Von der EMA wurde empfohlen, generell alle COX-Inhibitoren nicht über längere Zeiträume einzunehmen, da die bisherige Studienlage darauf schließen lässt, dass es sich um einen Gruppeneffekt aller NSAIDs bezüglich des kardiovaskulären Risikos handelt.

1.1.4 Cyclooxygenasen und Prostaglandine in der Niere

In der Niere wurde eine konstitutive COX-1-Expression in den renalen Gefäßen, den Glomeruli und in den kortikalen und medullären Sammelrohren nachgewiesen [13], [31], [32]. COX-2-mRNA wurde bei verschiedenen Säugetieren in der Macula densa der Niere und im kortikalen dicken ascendierenden Teil der Henle Schleife (*cortical thick ascending limb of Henle, cTALH*), sowie im Kortex nachgewiesen und wird hier ebenfalls konstitutiv exprimiert [13], [33].

Bei Menschen wurde COX-2 ebenfalls vermehrt bei über 60-jährigen in der Macula densa nachgewiesen [14]. Außerdem wurde in der humanen Niere COX-2 in Podozyten und in glatten Muskelzellen von Arteriolen nachgewiesen [34]. COX-2 ist ebenfalls reichlich im inneren Markbereich und in den Papillen exprimiert [13], [14], [35], einige Autoren berichteten über eine Expression der COX-2 im Bereich der medullären Sammelrohre [36], die vorherrschende Isoform ist hier allerdings die COX-1, so dass die Bedeutung der COX-2 im Sammelrohr unklar zu sein scheint.

Des Weiteren findet sich eine Koexpression der COX-1 mit der membrangebundenen Prostaglandin E2-Synthase (mPGE-S) mit einem starken Signal in der Immunhistochemie im medullären Teil des Sammelrohrs [37]. Ein weniger starkes Signal findet sich im kortikalen Teil des Sammelrohrs und den medullären interstitiellen Zellen. Eine Koexpression der COX-2 mit der mPGE-S findet sich ebenfalls in den medullären interstitiellen Zellen sowie in der Macula densa. Eine Expression der mPGE-S findet sich ohne Koexpression mit der COX-1 und COX-2 in den Epithelzellen des Nierenbeckens [37], [38].

Prostaglandine sind in der Niere wichtige Mediatoren bei der Regulation des Gefäßtonus, der Salz- und Wasserhomöostase und Reninfreisetzung. Hauptsächlich spielen hier PGE₂ und PGI₂ eine Rolle. PGE₂ ist an der Natriumresorption im distalen Tubulus beteiligt und agiert als Gegenregulationsmechanismus bei steigender Natriumkonzentration, indem die Natrium- und Wasserresorption vermindert wird [39]. PGI₂ und PGE₂ steigern die Kalium-Sekretion, in dem sie die Reninsekretion erhöhen und damit das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS) aktivieren. Diese vasodilatierend wirkenden Prostaglandine erhöhen gleichzeitig den renalen Blutfluss (RBF) und die glomeruläre Filtrationsrate (GFR) bei erniedrigtem zirkulierendem Blutvolumen. Bei jungen und gesunden Menschen spielen die Prostaglandineffekte in der Niere eine untergeordnete Rolle, während in Situationen wie beispielsweise Dehydratation, Herzinsuffizienz, Blutverlust und hohes Alter die Produktion renaler Prostaglandine ein wichtiger Kompensationsmechanismus darstellt. NSAIDs verhindern die Autoregulation und Kompensation des Blutflusses und sind wegen häufiger Anwendung bei eben genannten Situationen eine wichtige Ursache des akuten Nierenversagens [40]. Andererseits können NSAIDs zur Natriumretention führen und den Blutdruck steigern oder eine vorbestehende arterielle Hypertonie verschlechtern [41].

Entlang des gesamten Nephrons wird die mRNA der verschiedenen EP-Rezeptoren exprimiert [42] (Abb. 1.4). Die EP1-Rezeptor mRNA wurde hauptsächlich im Sammelrohr nachgewiesen, zunehmend

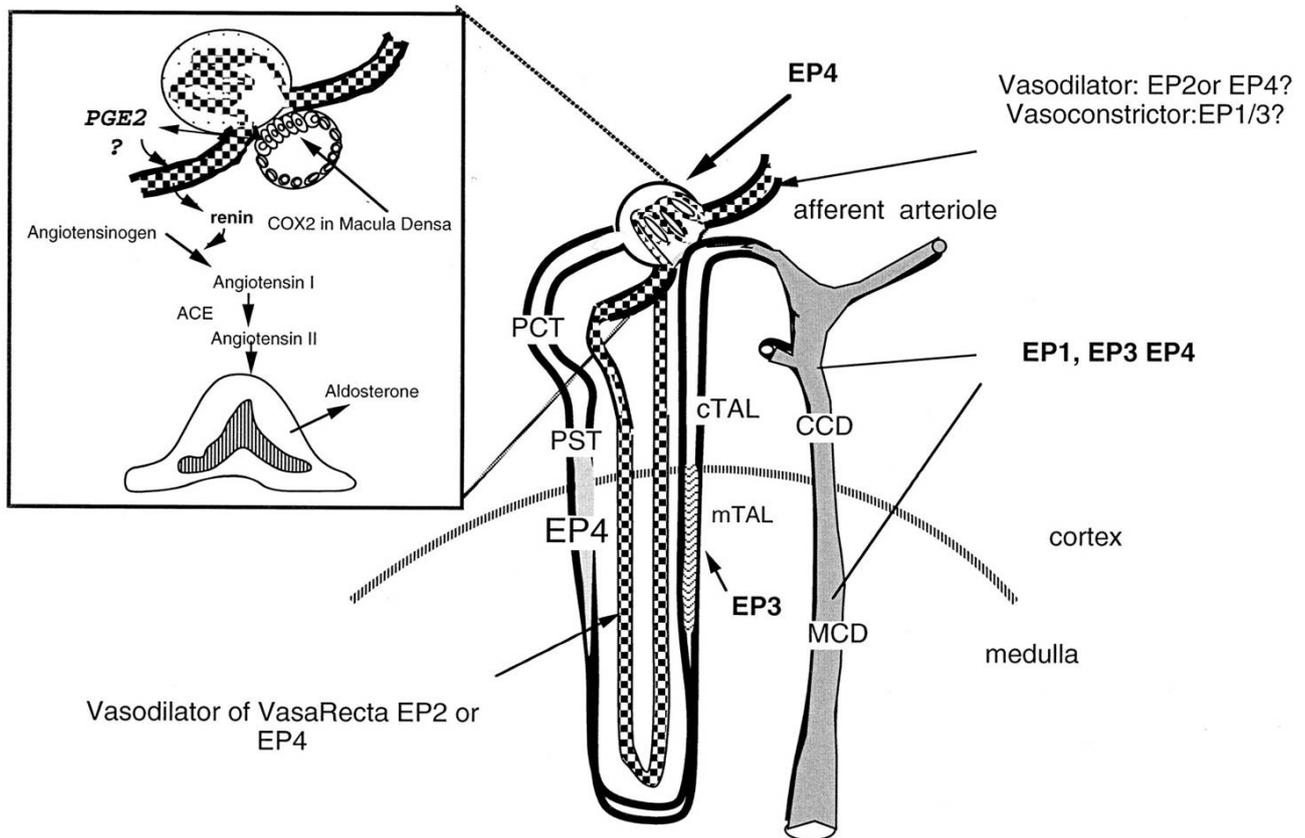


Abbildung 1.4: Intrarenale Lokalisationen der EP-Rezeptoren. Aus [46]. Abk.: PCT, Pars convoluta des proximalen Tubulus; PST, gerader Teil des proximalen Tubulus; cTAL und mTAL, kortikaler und medullärer Teil des dicken aufsteigenden Teil der Henle Schleife; CCD und MCD, kortikales und medulläres Sammelrohr

vom Kortex zur Papille und ist hier vermutlich an der Regulation des Natrium- und Wasserhaushaltes beteiligt [43]. Mittels Immunhistochemie (IHC) konnte die EP1-Rezeptor-Protein-Expression im Sammelrohr und in der Tunica media der Arterien, Vasa recta und peritubulären Kapillaren gezeigt werden [44]. Über den EP1-Rezeptor wird die Konzentration von intrazellulärem Ca^{2+} erhöht, woraus eine PGE_2 abhängige Natriuresis durch Hemmung des Na^+ -Transporters im Sammelrohr resultiert [45]. In nur geringen Mengen wird EP2-Rezeptor mRNA in der Niere exprimiert. $EP2^{-/-}$ -Mäuse zeigten jedoch auf hohe Salzgaben eine salzsensitive Hypertonie, weshalb vermutet wird, dass PGE_2 über den EP2-Rezeptor eine Rolle in der renalen Salzausscheidung spielt, in dem es die Natriumexkretion erhöht, außerdem könnte es somit an der Regulation des renalen Blutflusses beteiligt sein [46]-[48]. Eine weitere Wirkung des PGE_2 über den EP2-Rezeptor ist eine Stimulation der Aldosteronfreisetzung aus der Zona glomerulosa der Nebennierenrinde [49]. Immunhistochemisch wurde das EP2-Rezeptor-Protein nur in der Tunica media von Arterien und glomerulären Arteriolen nachgewiesen [44].

EP3-Rezeptor mRNA konnte im TALH und im Sammelrohr nachgewiesen werden, wahrscheinlich antagonisiert hier PGE_2 über den EP3-Rezeptor durch eine Inhibierung der cAMP-Bildung die Wirkung von anti-diuretisches Hormon (ADH) [43], [50]. Immunhistochemisch wurde der EP3-Rezeptor im späten distalen Tubulus und in den Sammelrohren nachgewiesen, wobei die Tunica media und das

Endothel der Arterien, Vasa recta und peritubulären Kapillaren starke Signale aufwiesen [44].

In den Glomeruli, sowie am distalen Tubulus und am Sammelrohr wurde eine Expression der EP4-Rezeptor mRNA gefunden. Eine Beteiligung von PGE₂ über den EP4-Rezeptor an der Regulation des renalen Blutflusses, der glomerulären Mikrozirkulation, der Reninfreisetzung und des Natrium- und Wasserhaushaltes wird angenommen [42], [51]. Das stärkste immunhistochemische EP4-Rezeptor mRNA-Signal zeigte sich in der Tunica media von Arterien und Vasa recta [44].

IP-Rezeptor-mRNA konnte im Bereich des Vas afferens der Glomeruli nachgewiesen werden [52].

Diverse Studien weisen darauf hin, dass PGE₂ und PGI₂ an der Regulation von Renin beteiligt sind. Auch der COX-2-Signalweg spielt eine mögliche Rolle bei der Reninregulation. Renin ist ein proteolytisches Enzym, welches von dem in der Leber gebildeten Angiotensinogen Angiotensin I abspaltet. Aus Angiotensin I wird über das „*angiotensin converting enzyme*“ (ACE) Angiotensin II (AT II) abgespalten. AT II ist ein starker Vasokonstriktor, zudem steigert es das Durstgefühl, fördert die Bildung von ADH und führt zur Aldosteronfreisetzung aus der Nebennierenrinde. Renin seinerseits ist ein wichtiger Bestandteil des sogenannten RAAS, an dessen Regulation die Säugetiere maßgeblich beteiligt ist. Durch Messung der luminalen Chloridkonzentration im Bereich der Macula densa werden je nach Bedarf die Anzahl der Na⁺-K⁺-2Cl⁻-Cotransporter (NKCC2) im TALH verändert [53]. Bei niedriger intrazellulärer Cl⁻-Konzentration steigt die COX-2-Expression an [54] und wird zusätzlich durch den NKCC2, sowie den Salz-Wasser-Haushalt reguliert.

AT II reguliert die Konzentration des Na⁺ über seine beiden Rezeptoren, während über den AT1-Rezeptor die Na⁺-Rückresorption gefördert wird, kommt es über den AT2-Rezeptor dagegen zur Na⁺-Ausscheidung. Die Regulation der Na⁺-Homöostase wird über die Aktivität des NKCC2 geregelt. Durch Aktivierung des AT1-Rezeptors steigt die Aktivität des NKCC2 und sinkt nach Aktivierung des AT2-Rezeptors. Zusätzlich könnte die Aktivität des NKCC2 über Stickstoffmonoxid (NO) reguliert werden. NO führt darüber hinaus auch zu einem Anstieg der COX-2-Expression [55], [56]. Es ist durchaus möglich, dass AT II auch die COX-2 über seine beiden Rezeptoren gegensätzlich reguliert, denkbar ist auch eine Regulation über den NKCC2.

AT2^{-/-}-Mäuse weisen eine erniedrigte COX-2-Expression auf, die durch ACE-Inhibitoren wahrscheinlich über den AT1-Signalweg induzierbar ist, dagegen zeigen AT1^{-/-}-Mäuse eine erhöhte COX-2-Expression [57]. Nach pharmakologischer Inhibition des RAAS beispielsweise durch einen ACE-Inhibitor wurde in der Macula densa eine erhöhte COX-2-Expression festgestellt, ebenso wurde eine erhöhte COX-2-Expression nach Behandlung mit einem AT1-Inhibitor festgestellt [58], [59]. Der Effekt auf die COX-2-Expression des AT1-Inhibitors ist nicht auf eine direkte Wirkung von AT II zurückzuführen, sondern beruht wahrscheinlich auf einer indirekten Wirkung durch den verminderten renalen Blutfluss [57].

Nach COX-Inhibition mit Indomethacin oder anderen COX-Inhibitoren konnten von verschiedenen Arbeitsgruppen verminderte Reninspiegel gemessen werden [60]-[65]. Eine Reninfreisetzung nach PGE₂- und PGI₂-Gabe wurde bei Hunden, Mäusen und Ratten beobachtet. Nach intrarenaler Infusion von AA beim Menschen und Kaninchen stieg der Reninspiegel ebenfalls an. [64], [66]-[68]

Die COX-2-Expression in der Macula densa und cTALH geht der Induktion der Reninsekretion durch salzarme Diät, Hemmung des ACE und renovaskuläre Hypertonie voraus [13], [59], [69]. Bei einer Minderung der Durchblutung der Niere wird ebenfalls Renin sezerniert [70]. Neben den eben genannten Funktionen bei der Regulation der Natrium- und Wasserhomöostase scheint die COX-2 bei der Nephrogenese eine große Rolle zu spielen. Ausführlich wird darüber in Kapitel 1.3 berichtet [71]-[73].

1.2 Die Nephrogenese

Die Nieren entwickeln sich aus den Vorstufen Vorniere (Pronephros), Urniere (Mesonephros) und Nachniere (Metanephros). Die Nachniere differenziert sich aus der Ureterknospe, die aus dem Uretergang aussprosst, dem metanephrogenen Blastem, in das die Ureterknospe hineinwächst und den Endothelzellen, welche die Gefäße der Niere bilden. Die Differenzierung erfolgt durch Zell-Zell-Interaktionen, z.B. kommt es zur epithelartigen Verdichtung im mesenchymalen Blastem, was die dichotome Aufzweigung der Ureterknospe induziert. Deren Aufzweigung induziert ihrerseits die Bildung der Metanephrosbläschen. Die Metanephrosbläschen wachsen in die Länge und bilden ein „S-förmiges“ Kanälchen, was sich zum Nephron entwickelt und in drei Abschnitte eingeteilt werden kann. Der obere Teil entwickelt sich zum distalen Tubulus und zum Pars ascendens des Intermediärtubulus. Der mittlere Abschnitt entwickelt sich zum proximalen Teil mit Pars descendens des Intermediärtubulus und den Abschnitten des proximalen Tubulus. Der untere Teil bildet das Glomerulum. An den Übergängen eines neugebildeten Nephrons in das Sammelrohr wird direkt die Bildung eines weiteren Nephrons induziert, so dass arkadenartige Nephronketten entstehen. Das epitheliale Bläschen sezerniert angiogenetische Faktoren. Dadurch werden im Laufe der weiteren Entwicklung Endothelzellen in die glomeruläre Kapsel angezogen. Sobald die afferenten Endothelzellen in engen Kontakt zum Epithel des Bläschens gelangt sind, plattet sich dieses ab und formt einen Kelch mit der Doppelblattstruktur der Bowman'schen Kapsel [74]. Aus den Anteilen der Ureterknospe entstehen das Nierenbecken, die Nierenkelche und die Sammelrohre. Die Nierenform entsteht durch die bei der Aufzweigung der Ureterknospe längeren Äste zu den Polen der Nierenanlage hin, als die zentral gelegenen Äste. Die Kanälchen der dritten bis fünften Generation verschmelzen zum Nierenbecken. Etwa ab der sechsten Aufteilung der Ureterknospe geht die Unterteilung des Nierenbeckens in große Kelche hervor, ab der siebten Aufzweigung bis zur elften entstehen die kleinen Nierenkelche, in die die Sammelrohre einmünden. Die Grundeinheit der Säugerniere ist ein Nierenkelch, in den eine Markpapille mit paral-

lel angeordneten Sammelrohren hineinragt. Die unipapilläre Niere besteht nur aus einer solchen Grundeinheit, während die Niere größerer Säugetiere aus mehreren Markpapillen besteht. Gegen Ende der Fetalzeit verschwinden die ampullären Erweiterungen der Ureterknospe und es bilden sich keine weiteren Nephrone mehr, dann entwickelt sich die Niere nur noch durch interstitielles Wachstum weiter [75].

Beim Menschen beginnen sich die Nieren ab der 5. Schwangerschaftswoche (SSW) zu entwickeln, die Glomeruli ab der 8. bis 9. SSW und die tubuläre Funktion wird ab der 14. SSW aufgenommen. Die volle Anzahl der Nephrone wird um die 36. SSW erreicht und beträgt zwischen 200.000 und über 1 Million, nach dieser Zeit werden keine weiteren Nephrone mehr gebildet [76], [77].

Bei Nagern, die eine Tragzeit von 19 bis 21 Tagen haben, setzt sich die Nephrogenese noch bis zum postnatalen Tag P7 bis Tag P10 fort. Die Tatsache, dass die postnatale Nephrogenese von Mäusen und Ratten etwa der 24. bis 32. SSW, also dem Übergang des zweiten zum dritten Trimenon einer Schwangerschaft bei Menschen entspricht, macht sie zu einem guten und einfachen Modell für die späte Phase der Nephrogenese [78].

1.2.1 Molekulare Regulation der Nephrogenese

An vielen der beschriebenen Vorgänge sind unterschiedliche Gene beteiligt. Ein grober Überblick über die beteiligten Gene und deren fehlende Expression gibt Tabelle 1.3 und Abb. 1.5. Die Daten stammen überwiegend aus Untersuchungen an Knockout-Mäusen.

1.3 Die gestörte Nephrogenese

1.3.1 Glucose-Spiegel

Hohe Glucose-Konzentrationen bei der Mutter, beispielsweise im Rahmen eines vorbestehenden Diabetes oder Gestationsdiabetes, können bei Menschen und in Tiermodellen eine gestörte Nephrogenese verursachen, gekennzeichnet durch renale Agenesie, Dysplasie und Hypoplasie [98]-[100]. Es wurde beobachtet, dass z.B. die Aufzweigung der Ureterknospe gestört ist, eine verminderte Anzahl von Nephronen, eine verringerte Expression von Proteoglykanen der Basalmembran, sowie die Depletion von ATP-Speichern und eine fulminante Apoptose von Mesenchymzellen und Ureterknospen-Epithel resultiert [101].

Bei der Regulation der Entwicklung des Embryos und seiner Organe spielen u.a. die sogenannten Homeobox-Gene (HOX) eine wichtige Rolle. Eine dieser Genfamilien heißt PAX-Gene, was von „*paired homeobox*“ kommt. Diese Gene kodieren hauptsächlich für verschiedene Transkriptionsfaktoren.

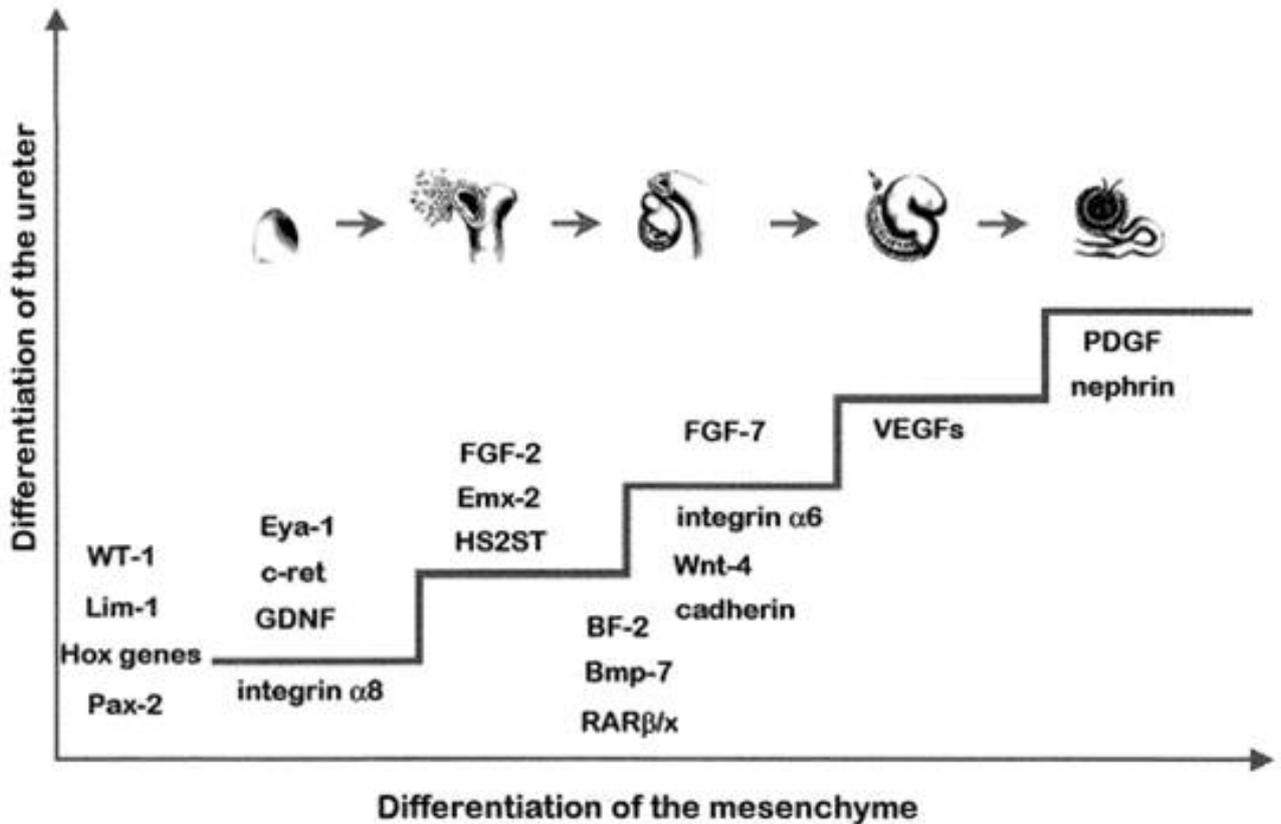


Abbildung 1.5: Schrittweise Aktivierung der Expression verschiedener Gengruppen bei der Entwicklung des Nephrons. Diese beinhalten sezernierte Faktoren (Wnt, FGF, und GDNF der TGF β -Gruppe), Rezeptoren (c-ret), Onkogene, Transkriptionsfaktoren, Signaltransduktoren (RAR α und RAR $\beta 2$), Enzyme (HS2-Sulfotransferase), proteolytische Enzyme und Extrazellulärmatrix-Bestandteile (Integrin- $\alpha 8$), Angiogenesefaktoren (VEGF) und Gene der Glomerulifunktion (PDGF, nephrin). Die Gene sind abgebildet in der Reihenfolge ihre Expression und ungefähren Erscheinung des Phänotyps bei der Knockout-Maus während der Morphogenese der Niere. Nach [97].

Tabelle 1.3: Zusammenfassung von Knockout-Maus Phänotypen und deren Defekte während der Nephrogenese.

Gen/ Knockout	Phänotyp	Referenz
Pax-2	Kleine oder fehlende Nachniere	[79]
Lim-1	Abnormalitäten während der Entwicklung des Urogenitals	[80]
N-myc	Fehlerhafte Urnierenentwicklung	[81]
WT-1	Keine Nachniere	[82]
Eya-1	Defekte beim Einsprossen des Urethers	[83]
Formin(ld)	Fehlende Nachniere	[84]
GDNF	Defekte der Uretherentwicklung, des Einsprossen und der Abzweigung	[85]
c-ret	Defekte der Uretherentwicklung, des Einsprossen und der Abzweigung	[86]
HS2ST	Abnormale Uretheraufzweigung	[87]
Integrin α 8	Defekte des Einsprossen und der Abzweigung des Urethers	[88]
Bmp-7	Fehlende Nachniere	[89]
Emx-2	Fehlerhafte Differenzierung des Urethers und Mesenchyms nach initialer Induktion	[90]
Wnt- 4	Fehlerhafte Epithelialisierung des Mesenchyms	[91]
PDGF	Defektes Kapillarknäuel der Glomeruli	[92]
FGF-7	Anzahl der Nephrone reduziert	[93]
AP-2	Apoptose des Sammelrohrs und distalen Tubulusepithels	[94]
Bcl-2	Defekte bei der Abzweigung des Urethers	[95]
BF-2	Fehlerhafte Entwicklung von Tubulussystem und Nephronen	[96]

PAX-Gene wurden für viele Spezies beschrieben, bei Menschen und Mäusen sind neun PAX-Gene bekannt, deren Expression während der Embryonalzeit für viele Gewebe beschrieben wurde [102]. PAX-2 wird während der Augen-, Ohren-, Zentralen-Nerven-System- (ZNS) und Urogenitaltrakt-Entwicklung exprimiert [103]. Bei der Nephrogenese wird PAX-2 sowohl in der Uretherknospe als auch im metanephrogenen Mesenchym exprimiert und ist hier unter anderem am reibungslosen Ablauf der Aufzweigung der Uretherknospe und der Mesenchym-Epithel-Transformation bei der Nierenentwicklung beteiligt [104], [105]. Mutationen im PAX-2 Gen verursachen Apoptose und sind assoziiert mit renaler Hypoplasie [106]-[109]. Allerdings ist für eine normale Nephrogenese wichtig, dass das PAX-2 Gen kontrolliert und gehemmt wird, was durch Interaktion zwischen PAX-2 und Wilms-Tumor-Supressor-Gen (WT 1) geschieht. In Wilms Tumoren kann das PAX-2 Gen stark exprimiert sein und korreliert mit der Proliferation wenig differenzierter Zellen, was auf eine gestörte Regulation von PAX-2 durch WT 1 zurück zu führen sein könnte [110].

Die über hohe Glucose-Konzentrationen induzierte PAX-2 Gen-Expression wird wahrscheinlich über „*reactive oxygene species*“ (ROS) und Aktivierung des PIP₂-/Akt-Kinase-/NF κ B-Signalweg vermittelt und verändert die Aufzweigung der Uretherknospe [111].

1.3.2 Utero-plazentare Insuffizienz und Glucocorticoidexcess

Bei utero-plazentarer Insuffizienz (UPI) kommt es durch ein unphysiologisches Umfeld zur Exposition des Fetus mit Stressoren, wie Hypoglykämie, Hypoinsulinämie, Azidose, Hypoxie und resultiert in einer intrauterinen Wachstumsverzögerung („*intrauterine growth restriction*“ IUGR) [112]. In Situationen von Hypoxie werden die Nieren schlechter durchblutet u.a. zu Gunsten von Gehirn und Herz. Dies führt zur „asymmetrischen Wachstumsverzögerung“ und ist assoziiert mit steigendem Risiko für Niereninsuffizienz und Hypertonie im Erwachsenenalter [113]. Verschieden Studien zeigten, dass IUGR mit kleineren Nieren und verminderter Anzahl von Nephronen einhergeht [114], [115]. An einem IUGR-Rattenmodell konnten u.a. erhöhte Corticosteroid-Werte gemessen werden. Es wurde gezeigt, dass hohe Glucocorticoidgaben zu reduzierter Nephronanzahl und reduzierter GFR, sowie Hypertonie in der Erwachsenenperiode führten [116], [117]. Die Ergebnisse einer Studie von Wintour *et al.* zeigten einen Effekt von Glucocorticoiden, die tragenden Schafen an Tag 26 und 28 der Tragzeit verabreicht wurden, auf die Nephronanzahl und die Entwicklung einer arteriellen Hypertonie in der Erwachsenenperiode [118].

Interessant ist, dass UPI am Tag P0 bei Ratten eine verminderte COX-2-Expression und eine verminderte 11 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase 2 (11 β -HSD 2) verursacht, was bis Tag P21 persistiert [114].

11 β -HSD 2 dehydrogeniert Corticosteroid zu 11-Dehydrocorticosteroid und ist in der Niere während der Nephrogenese in kortikalen Epithelzellen, proximalen und distalen Konvolut der Tubuli und im medullären Sammelrohr exprimiert [114]. Glucocorticosteroide sind u.a. an der Regulation vieler Organfunktionen auch in der Fetalzeit beteiligt. Beispielsweise sind sie an der Lungenreifung und an der Geburt beteiligt. Zu diesem Zeitpunkt werden in vielen Spezies sehr hohe Glucocorticoidwerte gemessen, die bei Ratten bis Tag P3 wieder auf Werte unter denen, adulter Ratten abgefallen sind. Gleichzeitig steigt die Expression von 11 β -HSD 2 zwischen der Geburt und Tag P3 an [119]. Auf der anderen Seite schützt 11 β -HSD 2, was in der Niere während der Organogenese in den genannten Teilen stark exprimiert wird, diese Strukturen vor der Wirkung des Corticosteroids am Glucocorticoid- und Mineralcorticoid-Rezeptor während der Fetalzeit [120], [121].

Madsen *et al.* zeigten bei der Ratte, dass hohe Gaben des für den Glucocorticoid-Rezeptor spezifischen Dexamethasons und des eher unspezifischen Corticosteroids während der postnatalen Phase die COX-2-Expression signifikant verminderte [119]. Während dieser Zeit ist der Cortisol-Spiegel normalerweise erniedrigt und die COX-2-Expression in der Niere erhöht [119]. Der Aldosteronspiegel steigt ebenfalls unter der Geburt an und sinkt dann um den Tag P3 auf Werte erwachsener Tiere, die Gabe des Aldosteronantagonisten Canrenoat zeigte keine Effekte auf das Nierengewicht und Körpergewicht, aber einen Anstieg der COX-2-Expression in der Niere, die Gabe des Aldosteronagonisten DOCA

zeigte weder einen Effekt auf das Nierenwachstum noch einen Effekt auf die COX-2-Expression [119].

In dieser Phase der Nierenentwicklung scheint es notwendig zu sein, dass es zur Suppression des Glucocorticoid-Wertes kommt, um die Expression der Glucocorticoid-supprimierten Signalwege, wie beispielsweise die Expression der renalen COX-2, zu ermöglichen, diese spielt eine große Rolle für die späte Nephrogenese.

1.3.3 NSAIDs, COX-2-Inhibitoren und COX-2^{-/-}-Mäuse

Beobachtungen im Rahmen vieler Studien zeigten, dass nach Einnahme von NSAIDs bei Schwangeren ein Oligohydramnion, bis hin zur Niereninsuffizienz in der Postnatalzeit auftrat, was u.a. durch Fehlbildungen im Bereich der Tubuli hervorgerufen wird. Neben der GFR, kann auch der RBF vermindert sein und kann durch erhöhte Kreatinin-Spiegel gekennzeichnet sein [122]-[126]. Mikroskopisch zeigen sich zu kleine Glomeruli in dilatierten Bowmankapseln, an denen sich atrophische Tubuli anschließen. Die glomerulären Gefäßschlingen sind von kuboiden oder zapfenförmigen Podocyten bedeckt, in den Nieren sind zahlreiche fibrotische und zystische Veränderungen zu sehen [122, 123]. In fetalen humanen Nieren wurden beide COX-Isoformen nachgewiesen, vor allem in der Zeit der aktiven Nephrogenese zwischen der 15. und 24. SSW. Die Expression der COX-1 wurde in Podozyten und im Sammelrohr beobachtet und die der COX-2 in der Macula densa, im TALH, im juxtamedullären Kortex und im Endstadium der Nephrogenese in den Podozyten [32], [127]. Die Expression der COX-2 in der Niere der Maus ist an den ersten postnatalen Tagen am höchsten und fällt dann bis in die Erwachsenenphase ab, während die der COX-1 konstant exprimiert wird [128].

COX-1^{-/-}-Mäuse zeigen keine Pathologien der Nieren, während COX-2^{-/-}-Mäuse u.a. multiple Nierenschäden aufweisen. Die Nieren sind klein und blass und haben eine granuläre Oberfläche. Mikroskopisch zeigt sich subkapsulär abnormales Parenchym mit kleinen Glomeruli und Tubuli, einer Hypoplasie der Nephrone entsprechend. Der Kortex erscheint zudem dünner und teilweise scheint die Anzahl der Nephrone reduziert zu sein. Daneben finden sich zystische Veränderungen im subkapsulären Bereich. Die Glomeruli außerhalb der atrophischen Areale sind hyperplastisch. Ältere Tiere über 10 Wochen, zeigen eine schwere interstitielle Fibrose, assoziiert mit fokal-segmentaler Glomerulosklerose. Die Schwere der Veränderungen ist mit dem Alter der Mäuse progredient.

Die renalen Arterien und Arteriolen zeigen keine pathologischen Auffälligkeiten. Interessanterweise unterscheidet sich die Histologie der Niere zwischen Wildtyp-Mäusen und COX-2^{-/-}-Mauswelpen an Tag P3 nicht, man sieht eine normale subkapsuläre Zone von sich entwickelndem Nierengewebe, auch an Tag P7 sind noch keine Unterschiede in der Nierenhistologie zu sehen. An Tag P10 zeigen einige der COX-2^{-/-}-Mäuse schon zystische Veränderungen und kleine dichtgelagerte Glomeruli, ab Tag P14 unterscheiden sich alle COX-2^{-/-}-Mäuse von den Wildtyp-Mäusen [73]. Diese histologischen Daten

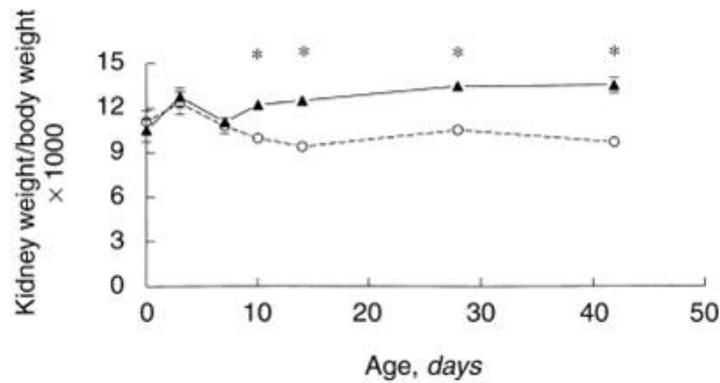


Abbildung 1.6: Nierenwachstum, dargestellt als das Verhältnis aus Nierengewicht zu Körpergewicht, von Wildtyp (▲) und COX-2^{-/-}-Mäusen (○) während der ersten sechs Lebenswochen. (*p<0,001) Aus [73].

decken sich mit den Nierenquotienten, errechnet aus Körpergewicht zu Gesamtnierengewicht x 1000, wie Abb. 1.6 zeigt. Auch die GFR von COX-2^{-/-}-Mäusen ist im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen auf etwa 50% reduziert, Serum-Kreatinin und -Harnstoff sind erhöht [71]-[73]. Weitere Phänotypen von COX-1^{-/-} und COX-2^{-/-}-Mäusen sind in Tabelle 1.4 aufgelistet.

Die Ergebnisse aus den Studien an COX-2^{-/-}-Mäusen decken sich mit den Beobachtungen von Kömhoff *et al.*, die schwangeren Mäusen einen experimentellen selektiven COX-1- und COX-2-Inhibitor bis Tag P0 oder Tag P21 verabreichten. Der experimentelle COX-1-Inhibitor SC-560 zeigte keinen Effekt. Der experimentelle COX-2-Inhibitor SC-236 zeigte einen Effekt, wenn er bis Tag P21 verabreicht wurde. Die Nieren von Tieren, die bis Tag P0 über die Plazenta SC-236 erhielten, zeigten keinen Effekt. Tiere, die erst ab Tag P0 SC-236 erhielten, zeigten ebenfalls einen Effekt auf die Nephrogenese [128].

1.3.4 Renin-Angiotensin-System

Angiotensinogen wurde in fetalen Maus- und Rattennieren im proximalen Tubulus detektiert und steigt um die Geburt an. Die Expression ist in den ersten postnatalen Tagen am höchsten [130]. Während der Nephrogenese ist die Renin-Expression um ein vielfaches erhöht. Sie ist vor allem in den größeren intrarenalen Arterien lokalisiert und wandert während der Nephrogenese in die juxtaglomerulären Zellen, einer der Hauptlokalisation bei erwachsenen Tieren [131]. Auch ACE ist während der Nephrogenese von Ratten in der Niere exprimiert und hat einen Gipfel zwei Wochen postpartal [132]. Der AT1-Rezeptor wird in verschiedenen Organen exprimiert, eingeschlossen ist u.a. der renale Kortex. Dessen Expression ist am höchsten in der postnatalen Periode und ist hauptsächlich in Blutgefäßen, Glomeruli und Tubuli lokalisiert. Keine Expression des AT1-Rezeptors wurde interessanterweise in der Papille und Medulla gefunden, den Ort der hauptsächlich Schädigung durch RAAS-Inhibition. Der AT2-Rezeptor wird während der Fetalzeit exprimiert und findet sich hauptsächlich in undifferen-

Tabelle 1.4: : Phänotypen von COX-1^{-/-}- und COX-2^{-/-}-Mäusen nach [129], Abk.: TPA, (12-O-tetradecanoylphorbol 13-acetate).

Phänotyp	COX-1 ^{-/-}	COX-2 ^{-/-}
Überlebensrate	Normal	Nur 60% überleben die Entwöhnung. Bis zu 75% der Überlebenden werden 1 Jahr alt
GIT	Keine spontanen Ulzerationen, Reduzierter Rückgang von induzierten Ulzerationen Magen pH 1,5	Keine spontanen Ulzerationen, Reduzierter Rückgang von induzierten Ulzerationen Magen pH 3,5
Niere	Normal	Progressive Nierenerkrankung
Fertilität von Männchen	Normal	Normal
Fertilität von Weibchen	Verspätete Geburt, sonst normal	Infertilität durch reduzierte und fehlende Ovulation, Implantation und Dezydualisation
Prostaglandin-Spiegel	1% der Normalwerte, gesunder Tiere nicht induzierbar	Normal, nicht induzierbar
Entzündungsreaktion Ohrödem	Reduziert nach AA, TPA induziert Ödem	Normal nach AA, TPA induziert Ödem
Infektion	Normal ?	Vermehrt Peritonitis

ziertem Mesenchym, bei adulten Tieren findet er sich in renalen Gefäßen, den Glomeruli und in den Tubuli [133]-[138].

Bei Angiotensin II-Rezeptor-Typ 1 (AT1)^{-/-}-Mäusen zeigen sich wie bei den COX-2^{-/-}-Mäusen renale Veränderungen, die allerdings unterschiedlich sind. AT1^{-/-}-Mäuse zeigen eine Hydronephrose, renale Papillenatrophie und eine verzögerte Reifung der Glomeruli, sowie hyperplastische glatte Muskelzellen der Nierengefäße, in denen die Renin-Expression stark erhöht ist [139]. Die funktionellen Konsequenzen der fehlenden RAAS Komponenten sind eine gestörte Fähigkeit zur Harnkonzentrierung, sowie tubulointerstitielle Schäden, die sich in einer Dilatation oder Atrophie der Tubuli äußern, von einer verminderten Expression von E-Cadherin begleitend, sowie interstitielle Entzündung und Fibrose. Des weiteren wurde an Angiotensinogen^{-/-}-Mäusen beobachtet, dass diese sehr hypoton sind [140]. Die oben genannten renalen Veränderungen zeigen sich ebenfalls bei Renin- [141], Angiotensinogen- [142] und ACE-defizienten [143] Mäusen. Die genannten renalen Veränderungen entsprechen kaum denen der COX-2^{-/-}-Mäuse, diese zeigen keine Mediahypertrophie und keine Papillenatrophie.

Die pharmakologische Inhibition des RAAS während der Nephrogenese induziert ebenfalls irreversible Schäden an der Niere, die denen der Knockout-Mäuse entsprechen. Diese Effekte werden wahrscheinlich über den AT1-Rezeptor vermittelt und nicht über den AT2-Rezeptor [144]. Eine gestörte Nephrogenese verursacht letztendlich auch eine Anfälligkeit für kardiovaskuläre Erkrankungen [144]-[146]. Auch an Schweinen, die in der Phase der Nephrogenese mit Enalapril behandelt wurden, zeigten sich

beinahe identische histologische Veränderungen an der multipapillären Niere [147].

Die gestörte Tubulogenese wird möglicherweise auch durch die interstitielle Entzündung hervorgerufen, da in den Ratten, die in der Neonatalzeit mit Enalapril behandelt wurden, eine Überexpression von TNF- α und eine Invasion von Monozyten und Makrophagen festgestellt wurde [148].

Das RAAS spielt während der Nephrogenese wahrscheinlich eine große Rolle, da alle Komponenten des RAAS in den Nieren von Ratten und Mäusen in der perinatal Zeit verglichen mit adulten Tieren erhöht sind [149].

Es ist möglich, dass Angiotensin II ein direkter Wachstumsfaktor während der Nephrogenese ist und ein Mangel die Balance zwischen Proliferation und Apoptose stören könnte. Zudem reguliert AT II möglicherweise die Synthese weiterer Wachstumsfaktoren.

Zur Unterstützung dieser These wurde in Ratten, die mit Enalapril behandelt wurden, eine verminderte *Insulin-like growth factor-I* (IGF-I) mRNA-Expression vor allem im Nierenmark festgestellt. Ebenso wurde eine erhöhte Expression von *IGF-binding protein 1* (IGFBP 1) mRNA festgestellt. IGF-I wird von IGFBP 1 gebunden, was zu einer reduzierten Verfügbarkeit von IGF-I im Nierenmark führt [150]. Von Interesse könnte auch sein, dass in Angiotensinogen-defizienten Mäusen PDGF-B mRNA in den Endothelzellen der verdickten renalen Arterien hochreguliert ist und PDGF-A mRNA seinerseits in der atrophierten Papille herunterreguliert ist [142]. Caspase 1-, 3- und 6-Aktivität ist im Nierenmark bei mit ACE-Inhibitoren behandelten Ratten erhöht, was eine laufende Apoptose widerspiegelt. Die vorliegenden Ergebnisse lassen darauf schließen, dass die Inhibition des RAAS während der Nierenentwicklung die Expression vieler Wachstumsfaktoren verändert [150].

Ein intaktes RAAS scheint des weiteren auch für die Zell-Zell und Zell-Matrix-Interaktionen wichtig zu sein. In den dilatierten Tubuli des Nierenmarkes der mit Inhibitoren des RAAS behandelten Ratten wurde ein Mangel an E-Cadherin festgestellt, was ein Schlüsselmolekül für Zell-Zell-Interaktionen ist und an der Bildung von polarisiertem Epithel beteiligt ist. Neben E-Cadherin werden weitere Bestandteile des Zytoskeletts, Zytoskelett assoziierte Proteine und extrazelluläre Matrix (ECM), wie Syndecan 2 und Integrin- α 6 supprimiert [150].

1.4 Glykogen-Synthase-Kinase-3-und Akt-Signalweg

1.4.1 Akt-Kinase

Die Studien an Akt^{-/-}-Mäusen haben u.a. gezeigt, dass Akt 2^{-/-}-Mäuse einen Diabetes Typ II entwickeln, während Akt 1^{-/-}- und Akt 3^{-/-}-Mäuse sämtlich zu kleine Organe, vor allem jedoch zu kleine Gehirne mit reduzierter Neuronanzahl haben [151]-[153]. Ob es an den Nieren der Akt-Knockout-

Mäuse histologische Veränderungen im Sinne, der von uns an COX-2^{-/-}-Mäusen beobachtet wird, wurde bisher nicht untersucht.

Drei Angehörige der Akt-Familie wurden auch bei Menschen identifiziert. Die Serin/Threonin-Kinasen Akt 1/PKB α , Akt 2/PKB β und Akt 3/PKB γ [154]. Die Akt-Kinasen haben untereinander eine ähnliche Struktur und werden u.a. über eine Phosphatidylinositol 3-Kinase (PI3K) durch viele verschiedene Stimuli aktiviert, beispielsweise durch Insulin, IGF und EGF [155], [156].

Akt phosphoryliert und interagiert mit einer Vielzahl von Molekülen, die eine Rolle bei Zell-Wachstum, -Proliferation, -Überleben und -Differenzierung spielen [157]. Viele Studien haben gezeigt, dass Akt ein wichtiges Target für zukünftige Krebstherapien sein könnte. Bisher ist bekannt, dass Akt u.a. durch Angiogenesefaktoren, onkogene Wachstumsfaktoren und Zytokine aktiviert wird und damit Kreuzung für multiple Netzwerke von Onkogenen und Tumor Suppressor Genen ist. In einer Vielzahl humaner Krebszelllinien wurde die Aktivierung aller drei Akt-Kinasen gefunden [158], [159].

1.4.2 GSK-3

Die GSK-3 ist eine von mehreren Serin/Threonin-Kinasen, welche die Glykogensynthese phosphorylieren und damit an der Regulation des Glykogenstoffwechsels beteiligt sind. Bei Menschen sind zwei Isoformen bekannt, die GSK-3 α und die GSK-3 β , die auf unterschiedlichen Genen kodiert sind. Beide Isoformen sind an der Regulation von Zellzyklus und Differenzierung beteiligt [160].

Die GSK-3 β reguliert eine Vielzahl an Substraten durch Phosphorylierung u.a. des Transkriptionsfaktors β -Catenin [161], c-Jun [162], c-Myc [163], Glucocorticoid-Rezeptor [164], CREBP [165], NF κ B [166] und Cyclin D1 [167]. Die meisten Transkriptionsfaktoren werden durch die Phosphorylierung inhibiert. GSK-3 β ^{-/-}-Mäuse sind nicht lebensfähig und versterben in der Embryonalzeit wahrscheinlich als Folge einer fulminanten Apoptose der Leberzellen. Grund hierfür könnte eine gestörte Aktivierung des NF κ B-Signalweges sein [166]. Normalerweise wird über TNF die Akt aktiviert, die dann die GSK-3 β phosphoryliert. In GSK-3 β -defizienten Zellen bleibt nach Stimulation mit TNF die Akt-Aktivierung aus. Des Weiteren bleibt in diesen Zellen die Aktivierung der Transkription über NF κ B u.a. der COX-2, Cyclin D1 und MMP-9 auf den Trigger TNF aus, auch die Antwort auf die Aktivierung von NF κ B durch Lipopolysaccharide (LPS) und Interleukin-1 (IL-1) war aufgehoben. Stattdessen kommt es in diesen Zellen auf Grund der Stimulation durch TNF zu vermehrter Apoptose über den Caspase-3-Signalweg, der normalerweise über den NF κ B-Weg gehemmt wird [168]. Zusammenfassend kann man sagen, dass bei GSK-3 β defizienten Zellen auf TNF-Stimulation sowohl der NF κ B-Signalweg ausgeschaltet ist, als auch eine Aktivierung der Akt ausbleibt. Dies deutet darauf hin, dass es ein positives Feedback zwischen der GSK-3 β und der Akt gibt. In einigen Studien wird darüber berichtet, dass nach GSK-3-Inhibition mit Lithium, die Expression der COX-2 über NF κ B ansteigt und bei den Mäusen

eine Polyurie verursachte [169], [170].

Ein weiteres Substrat der GSK-3 β , das hier von Interesse ist, ist der Glucocorticoid-Rezeptor, dessen Phosphorylierung das Signal des Rezeptors abschwächt, die Folge ist eine verminderte Expression der Glucocorticoid-abhängigen NF κ B Transkripte [164].

1.4.3 Akt-/GSK-3-Signalwege

Die beiden PGE₂-Rezeptoren EP2 und EP4 sind G-Protein gekoppelte Rezeptoren (GPCR), welche die Adenylylcyclase aktivieren und intrazelluläres cAMP erhöhen, was die PKA aktiviert. Fujino *et al.* haben gezeigt, dass die Aktivierung der Adenylylcyclase über EP2 und EP4 zur Phosphorylierung der GSK-3 und Akt führt [171]. Interessant war bei dieser Studie, dass bei Inhibition der PKA die Phosphorylierung der GSK-3 blockiert wurde, jedoch die Akt- Phosphorylierung erhöht war und ein PI3K-Inhibitor die Phosphorylierung der Akt gehemmt hat, was bedeutet, dass bei Hemmung der Akt, das Signal über EP2 und EP4 direkt über die PI3K weitergeleitet wird [171]. Ein weiterer Signalweg, in den die Prostaglandine involviert sind, ist die Aktivierung des „*early growth response factor*“ (EGR-1) Signalweg über ERK-1/2, die PI3K und den EP4-Rezeptor, der ebenfalls eine Rolle bei Zellwachstum und -Differenzierung spielt [172]. Auch die Akt wird durch verschiedene Wachstumsfaktoren über die PI3K aktiviert und phosphoryliert die GSK-3 β , die dadurch inaktiviert wird. In ruhenden Zellen ist, im Gegensatz zu anderen Kinasen, die GSK-3 aktiv [173], [174].

GPCR können auch konstitutiv aktiviert sein und dann mit E-Cadherin interagieren und verursachen eine Aktivierung von Transkriptionsfaktoren u.a. über eine β -Catenin- Freisetzung und anschließender Aktivierung von T-Zell-Faktor (Tcf)/ *lymphoid enhancer Faktor* (Lef). E-Cadherin wird von β -Catenin gebunden [175]. Die Aktivierung eines GPCR durch PGF₂ führt zur verminderten Phosphorylierung von β -Catenin und stimuliert die Tcf/Lef-vermittelten Transkriptionsfaktoren [176]. Ein Schlüsselenzym des β -Catenin/Tcf-Signalweges ist die GSK-3. Dieses Enzym ist verantwortlich für die Phosphorylierung und den anschließenden Abbau von β -Catenin. Direkte Hemmung der GSK-3 führt zur Stabilisierung und Translokation von β -Catenin in den Zellkern, wo es durch Bindung an die Transkriptionsfaktoren der Tcf/Lef-Familie die Genexpression u.a. der COX-2 und Cyclin D1 aktiviert [177], [178]. Die GSK-3 kann durch Phosphorylierung inaktiviert werden, z.B. führt die Phosphorylierung der GSK-3 durch die Aktivierung des *frizzled*-Rezeptor über den Wnt1 Liganden dazu, dass der β -Catenin/Tcf-Signalweg aktiviert wird [171]. Ebenso kann die GSK-3 durch die Akt über den PI3K-Weg, sowie über den Proteinkinase A (PKA) phosphoryliert werden [174], [179]. Allerdings kann die PKA die GSK-3 auch direkt phosphorylieren [180].

1.5 Zielsetzung der Arbeit

COX-2^{-/-}-Mäuse zeigen an den Nieren multiple Pathologien. Histologisch sieht man subkapsulär abnormales Parenchym mit kleinen Glomeruli und Tubuli, einer Hypoplasie der Nephrone entsprechend. Der Kortex erscheint dünner und die Anzahl der Nephrone reduziert. Daneben finden sich zystische Veränderungen im subkapsulären Bereich. Die Glomeruli außerhalb der atrophischen Areale sind teilweise hyperplastisch. Auch durch Inhibition der COX-2 mit dem experimentellen COX-2-Inhibitor SC-236 kommt es zu ähnlichen histologischen Veränderungen an der Niere. Klinisch wurden oder werden vor allem in der Therapie von Erkrankungen des rheumatischen Formenkreises, aber auch zur Prävention von Neoplasien im Darm bei familiärer adenomatöser Polyposis die Coxibe, eine Gruppe COX-2 selektiver Inhibitoren eingesetzt. Rofecoxib, Lumiracoxib und Valdecoxib wurden nach 2004 wieder vom Markt genommen, da eine erhöhte Rate an kardiovaskulären Ereignissen aufgetreten war, wie z.B. Myokardinfarkte. Des weiteren werden u.a. in der Therapie von Schmerzen und Entzündung die unspezifischen COX-Inhibitoren eingesetzt. Dies macht sie zu einer der am häufigsten eingesetzten Medikamentengruppen weltweit.

Weitere Mechanismen sind an der Nephrogenese beteiligt und viele dieser Signalwege sind letztendlich noch nicht vollständig geklärt. Einer dieser Mechanismen könnte das RAAS sein, da nach Inhibition des RAAS während der Nephrogenese und an verschiedenen Knockout-Mäusen ebenfalls Veränderungen an der Niere aufgefallen sind, die jedoch nicht identisch mit denen der COX-2^{-/-}-Mäuse sind. Auch der Akt- und GSK-3-Signalweg könnte in die Mechanismen der Nephrogenese involviert sein, ebenso gibt es Hinweise auf Kreuzungsstellen zwischen dem COX-2-Signalweg und dem Akt/GSK-3-Signalweg über PGE₂.

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich nun mit der Frage, ob es sich bei den oben genannten Nierenveränderungen um einen Effekt durch die Substanz SC-236 handelt oder ob die klinisch eingesetzten selektiven COX-2-Inhibitoren in der bei Menschen empfohlenen Dosierung ebenfalls vergleichbare Veränderungen verursachen. Ob es innerhalb dieser Gruppe Unterschiede zwischen den Substanzen gibt, von einem Klasseneffekt der Coxibe ausgegangen werden kann oder es sich hierbei sogar um einen Gruppeneffekt NSAIDs handelt, waren in dieser Arbeit von Interesse. Des weiteren beschäftigt sich diese Arbeit mit der Frage nach dem Zeitfenster der erhöhten COX-2-Expression während der Spätphase der Nephrogenese und ob die Gabe von SC-236 in den Tagen der höchsten Expression die genannten Nierenveränderungen verursachen kann und ob die Veränderungen an der Niere nach Beendigung der Behandlung reversibel sind. Ob es nach Gabe eines ACE-Inhibitors oder eines AT1-Rezeptor-Antagonisten Parallelen zu den Veränderungen an der Niere der COX-2^{-/-}-Mäusen und welche Veränderungen sich nach Gabe eines GSK-3 β - und Akt-Inhibitors an der Niere zeige, sowie Parallelen zu den renalen Veränderungen der COX-2^{-/-}-Mäuse war eine weitere Fragestellung der

vorliegenden Arbeit.

Kapitel 2

Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien und Reagenzien

Substanz	Hersteller, Ort
Absolute QPCR ROX Mix	ABgene, Surrey (UK)
Absolute QPCR SYBR Mix	ABgene, Hamburg (D)
Agarose NEE0	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe (D)
Goat-anti-COX-2-IgG (M19 +N20, 1:1)	Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA (USA)
APS	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe (D)
BCA Protein Assay Kit	Pierce, Rockford, IL (USA)
Bromphenolblau	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg (D)
Calciumchlorid x 2H ₂ O	Merck KgaA, Darmstadt (D)
Celecoxib	Witega, Labororien- Adlershof, Berlin (D)
Chloroform	Merck KgaA, Darmstadt (D)
DEPC	Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH, Seelze (D)
Diclofenac	Sigma- Chemie, Deisenhofen (D)
Dinatriumhydrogenphosphat x 2H ₂ O	Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH, Seelze (D)
DMC	Witega, Labororien- Adlershof, Berlin (D)
DMSO	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe (D)
DNA-Größenstandard (1 kb plus DNA-Ladder)	Invitrogen, Karlsruhe (D)
DTT	Merck KgaA, Darmstadt (D)

EDTA (Idranal III)	Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH, Seelze (D)
Enalapril	Sigma-Aldrich, Steinheim (D)
Entellan, Eindeckmedium	Merck KgaA, Darmstadt (D)
Eosin-S	Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH, Seelze (D)
Essigsäure 100%	Merck KgaA, Darmstadt (D)
Ethanol absolut	Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH, Seelze (D)
Ethidiumbromid	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe (D)
Etoricoxib	Witega, Labororien-Adlershof, Berlin (D)
Glycerol	AppliChem GmbH, Darmstadt (D)
Glycin	AppliChem GmbH, Darmstadt (D)
GSK-3 β -Inhibitor VII	Calbiochem, Merckbioscience, Darmstadt (D)
Hmatoxylin nach Gill	Sigma-Aldrich Laborchemikalien, Seelze
Human 18-S-rRNA	Applied Biosystems, Warrington (UK)
IRDye 680 Donkey-anti-Goat-IgG	LiCor Bioscience Corp., Lincoln, Nebraska (USA)
Isofluran (Forene)	Abbott GmbH & Co. KG, Wiesbaden (D)
Isopropanol 100%	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe (D)
Kaliumchlorid	Merck KgaA, Darmstadt (D)
Kaliumdihydrogenphosphat	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe (D)
Lumiracoxib	Goethe-Universität, Frankfurt/ Main, (D) Prof. Geisslinger
Magnesiumchlorid x 6H ₂ O	Merck KgaA, Darmstadt (D)
Methanol 100%	Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH, Seelze
Naproxen	Sigma-Aldrich, Steinheim (D)
Natriumacetat	Merck KgaA, Darmstadt (D)
Natriumchlorid	AppliChem GmbH, Darmstadt (D)
Natriumhydrogencarbonat	Merck KgaA, Darmstadt (D)
Naturafloer, Magermilchpulver	Töpfer GmbH, Dietmannsried (D)
Paraformaldehyd	Sigma-Aldrich, Laborchemikalien, Seelze (D)
Paraplast Plus, Paraffin	McCormick Scientific, St. Louis, MO (USA)
Pefablock SC	Biogene-Alexis GmbH, Grünberg (D)
Ponceau S	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe (D)
Primer Oligo (dT) 12-18	Invitrogen, Karlsruhe (D)

Primersequenzen	BioSpring, Frankfurt am Main, (D)
Proteinase K, 10 mg/ml	Sigma-Aldrich, Steinheim (D)
RNeasy Mini Kit	Quiagen, Hilden (D)
Rofecoxib	MSD Sharp & Dohme GmbH, Haar (D)
Rotiphorese Gel 30 mit 30% Acrylamid und 0,8% Bisacrylamid	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe (D)
Salzsäure, rauchend	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe (D)
SC-236	Calbiochem, Merckbioscience, Darmstadt (D)
SC-560	Calbiochem, Merckbioscience, Darmstadt (D)
SC-791	Calbiochem, Merckbioscience, Darmstadt (D)
SDS	AppliChem GmbH, Darmstadt (D)
SuperScript II RT	Invitrogen, Karlsruhe (D)
Taq DNA Polymerase	Sigma-Aldrich, Steinheim (D)
Telmisartan	Sigma-Aldrich, Steinheim (D)
TEMED	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe (D)
Triciribine (Akt-Inhibitor-2)	Calbiochem, Merckbioscience, Darmstadt (D)
Tris-Base	AppliChem GmbH, Darmstadt (D)
Tris-HCl	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe (D)
Triton X-100	Merck KgaA, Darmstadt (D)
Tween 20	AppliChem GmbH, Darmstadt (D)
Valdecoxib	Pharmacia
Xylencyanol FF	AppliChem GmbH, Darmstadt (D)
Xylol	Sigma-Aldrich, Laborchemikalien, Seelze (D)

2.1.2 Prüfsubstanzen

In der Arbeit wurden neben Diclofenac und Naproxen als Vertreter der klassischen NSAIDs, die Coxibe Celecoxib, Etoricoxib, Lumiracoxib, Rofecoxib und Valdecoxib eingesetzt. Zusätzlich wurde Dimethylcelecoxib (DMC) verabreicht, was ein Derivat des Celecoxibs ist, jedoch keine COX-2 Hemmung besitzt und zwei experimentelle Substanzen, die selektiv die COX-2 hemmen, SC-236 (IC₅₀ = 10 nM und etwa 18.000-fache COX-2 Selektivität, laut Hersteller) und SC-791 (IC₅₀ = 4 nM für hCOX-2 vs. IC₅₀ = 114 μM für hCOX-1, laut Hersteller) und eine experimentelle Substanz, die spezifisch die COX-1 hemmt, SC-560 (IC₅₀ = 9 nM für COX-1 und IC₅₀ = 6,3 μM für COX-2, laut Hersteller). Daneben wurde der ACE-Hemmer Enalapril und der Angiotensin II-Rezeptor-Typ 1-Inhibitor Telmis-

artan verabreicht, sowie der experimentelle Inhibitor der Akt-Kinase Triciribine und der Inhibitor der GSK-3 β . Bei Enalapril und Telmisartan, sowie Triciribine und GSK-Inhibitor ergab sich das Problem, dass die Mauswelpen während der ersten Versuchsreihe in den ersten Tagen verstarben (Konzentration in Klammern), weshalb bei der zweiten Versuchsreihe eine deutlich niedrigere Dosis eingesetzt wurde. Die Dosierung der Substanzen orientierte sich nach der beim Menschen klinisch angewandten Dosierung multipliziert mit dem Faktor 10 (entsprechend dem gesteigerten Stoffwechsel der Maus). Eine Ausnahme bildete die Substanz Naproxen, hier wurde auf Grund von Erfahrungsberichten und der niedrigen LD50 die Dosis von 150 mg/kg·KG aus Sicherheitsgründen auf 50 mg/kg·KG reduziert. Alle Prüfsubstanzen wurden in DMSO gelöst und in folgenden Endkonzentrationen eingesetzt:

Pharmakon/ Synonym/ Summenformel/ Molekulargewicht	Konzentration [mg/kg·KG]
Celecoxib 4-[5-(4-methylphenyl)-3-(trifluoromethyl)-pyrazol-1-yl]-benzensulfonamid $C_{17}H_{14}F_3N_3O_2S$ Molekulargewicht: 381,37 g/mol	100
Diclofenac 2-[2-[(2,6-Dichlorphenyl) amino]-phenyl]-essigsäure $C_{14}H_{11}Cl_2NO_2$ Molekulargewicht: 296,15 g/mol	20
DMC $C_{19}H_{20}F_3N_3O_2S$ 2,5-Dimethylcelecoxib	100
Enalapril 1-[N-((S)-1-ethoxycarbonyl-3-phenylpropyl)-(S)-alanyl)-(S) - prolin $C_{20}H_{28}N_2O_5$ Molekulargewicht: 376,5 g/mol	0,1 (1)
Etoricoxib 5-Chlor-6'-methyl-3-[4-(methylsulfonyl)-phenyl]-2,3'-bipyridin $C_{18}H_{15}ClN_2O_2S$ Molekulargewicht: 358,84 g/mol	35
GSK-Inhibitor α -4-Dibromoacetophenone $C_8H_6Br_2O$ Molekulargewicht: 277,9 g/mol	0,25 (1)

<p>Lumiracoxib 2-((2-Chlor-6-fluor-phenyl)amino)-5-methyl-phenylessigsäure $C_{15}H_{13}ClFNO_2$ Molekulargewicht: 293,72 g/mol</p>	50
<p>Naproxen (S)-2-(6-Methoxy-2-naphthyl)-propionsäure $C_{14}H_{14}O_3$ Molekulargewicht: 230,26 g/mol</p>	50
<p>Rofecoxib 4-[4-(Methylsulfonyl)-phenyl]-phenylfuran-2(5H)-on $C_{17}H_{14}O_4S$ Molekulargewicht: 314,4 g/mol</p>	10
<p>SC-236 [4-[5-(4-Chlorophenyl)-3-(trifluoromethyl)-1-pyrazol-1-yl]- Benzenesulfonamid] $C_{16}H_{11}ClF_3N_3O_2S$ Molekulargewicht: 401,8 g/mol</p>	20
<p>SC-560 5-(4-Chlorophenyl)-1-(4-methoxyphenyl)-3-(trifluoromethyl)-1H- pyrazol $C_{17}H_{12}ClF_3N_2O$ Molekulargewicht: 352,74 g/mol</p>	20
<p>SC-791 4-[(5-Difluoromethyl-3-phenyl)-4-isoxazolyl]-benzenesulfonamid $C_{16}H_{12}F_2N_2O_3S$ Molekulargewicht: 350,3 g/mol</p>	20
<p>Telmisartan 4'[(1,4'-Dimethyl-2'-propyl[2,6'-bi-1H-benzimidazol]-1'-yl)- methyl]-[1,1'-biphenyl]-2-carboxylic Säure $C_{33}H_{30}N_4O_2$ Molekulargewicht: 514,62 g/mol</p>	0,1 (1)
<p>Triciribine Akt/PKB-Signaling-Inhibitor-2 $C_{13}H_{16}N_6O_4$, Molekulargewicht: 320,3 g/mol</p>	0,25 (1)

Valdecoxib 4-(5-Methyl-3-phenylisoxazol-4-yl)-benzensulfonamid $C_{16}H_{14}N_2O_3S$ Molekulargewicht: 314,36 g/mol	10
--	----

2.1.3 Puffer und Lösungen

DNA-Isolation	
Schwanz-Lyse-Puffer	15,76 g Tris-HCl [entspr. 100 mM], pH 8,5 1,46 g EDTA [entspr. 5 mM] 2 g SDS 11,69 g NaCl [entspr. 200 mM] ad 1000 mL ddH ₂ O
TE-Puffer	1 mL 1 M Tris, pH 8 200 μ L 0,5 M EDTA ad 100 mL ddH ₂ O

PCR und Gelelektrophorese	
PCR-Mastermix	2 μ L 10 x PCR-Puffer 2 μ L 2 mM dNTP 1 μ L 10 mM F-Primer 1 μ L 10 mM R-Primer 11,75 μ L DEPC-H ₂ O 0,25 μ L Taq-DNA-Polymerase
Agarosegel 1,5	1,5 g Agarose ad 100 mL 1 x TAE 4 μ L Ethidiumbromid [10 mg/mL]
50 x TAE-Puffer	242 g Tris-HCl [entspr. 2 M] 100 mL 0,5 M EDTA, pH 8 57,1 mL 100% Eisessig ad 1000 mL ddH ₂ O
1 x TAE-Puffer	20 mL 50 x TAE-Puffer ad 1000 mL ddH ₂ O

6 x Probenpuffer	0,25% Bromphenolblau 0,25% Xylencyanol 15 mL 30% Glycerol ad 35 mL ddH ₂ O
------------------	--

Gewebehomogenisation	
Tris-Puffer	50 mM Tris-HCl, pH 7,4 10 μ L auf 1 mL Pefa Block
Membranlysepuffer	50 mM Tris-HCl, pH 7,4 10 mM Triton X-100 20% Glycerin

Western Blot und SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE)	
Trenngel-Minigel 10%	2,08 mL ddH ₂ O 1,23 mL 1,5 M Tris, pH 8,8 1,64 mL Acrylamidlösung 49,2 μ L 10% SDS 24,6 μ L 10% APS 2,46 μ L TEMED
Sammelgel	1,2 mL ddH ₂ O 0,5 mL 0,5 M Tris, pH 6,8 0,25 mL Acrylamidlösung 20 μ L 10% SDS 20 μ L 10% APS 4 μ L TEMED
4 x Lämmli-Puffer	0,24 g Tris-HCl [entspr. 0,2 M] 1 g SDS 4 mL Glycerol Spatelspitze Bromphenolblau ad 10 mL ddH ₂ O mit HCl, pH 6,8 einstellen
10 x SDS Laufpuffer	30 g Tris-Base 150 g Glycin 10 g SDS

KAPITEL 2. MATERIAL UND METHODEN

	ad 1000 mL ddH ₂ O
1 x SDS Laufpuffer	100 mL 10 x SDS Laufpuffer ad 1000 mL ddH ₂ O
Western Blot-Puffer	15,5 g Tris 72 g Glycin 1000 mL Methanol ad 5000 mL ddH ₂ O
10 x PBS (Phosphate-buffered-saline)	100 g NaCl 2,5 g KCl 17,7 g Na ₂ HPO ₄ x2 H ₂ O 2,5 g KH ₂ PO ₄ ad 1000 mL dd H ₂ O
1 x PBS	100 mL 10 x PBS ad 1000 mL ddH ₂ O
PBST	1 x PBS 0,1% Tween 20
Milchpulverlösung	5 g Magermilchpulver 100 mL PBS oder PBST

Fixieren von Organen	
PFA-Lösung 4%	24 g Paraformaldehyd 600 mL 1 x PBS NaOH und HCl, konzentriert
Carnoy-Lösung	300 mL 100% Ethanol 150 mL Chloroform 50 mL 100% Essigsäure

Hämatoxylin-Eosin-Färbung	
Hämatoxylin	Hämatoxylin nach Gill
Eosin	200 mL ddH ₂ O 2 mL 0,5% Eosin-Stammlösung

Reverse Transkription	
	11 µL RNA-Lösung

	1 μL 0,5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ Oligo dT (oder andere Primer z.B. Random-Primer)
Mastermix	2 μL 5 x First-Strand-Puffer 1 μL 10 mM dNTP 2 μL 0,1 M DTT 1 μL DEPC-H ₂ O 1 μL 200 U/ μL Reverse Transkriptase 1 μL Ribonuclease-Inhibitor

2.1.4 Primer

Die Oligonukleotide wurden von der Firma BioSpring synthetisiert und bezogen.

Name	Sequenz	Fragmentgröße
COX-2-Zucht-Primer		
WT-F	5'-ACA CAC TCT ATC ACT GGC ACC-3'	756 bp
WT-R	5'-TCC CTT CAC TAA ATG CCC TC-3'	
NEO-F	5'-CTT GGG TGG AGA GGC TAT TC-3'	280 bp
NEO-R	5'-AGG TGA GAT GAC AGG AGA TC-3'	
TaqMan-Primer		
COX-2-F	5'-AGA CAC TCA GGT AGA CAT GAT CTA CC-3'	193 bp
COX-2-R	5'-GGC ACC AGA CCA AAG ACT TCC-3'	

2.1.5 Geräte und Materialien

Gerät/ Material	Hersteller, Ort
Deckgläser	Waldemar Knittel GmbH, Braunschweig (D)
EDTA-Mikroprobengefäß	Sarstedt AG&Co, Nümbrecht (D)
Elektrophorese-Kammer	Owl Scientific, Woburn (USA)
Faserlichtquelle FLQ 85 E	Helmut Hund GmbH, Wetzlar (D)
Feinwaage, Mettler H 64	Albert Jordan, Frankfurt (D)

Festwinkelrotor FA-45-24-11	Eppendorf, Hamburg (D)
GraphPad Prism 4 Software	GraphPad Software Inc., La Jolla, CA (USA)
Histoknife H, Microtomklingen	Heraeus-Kulzer, Werheim/Ts. (D)
Image J Software	National Institute of Health (USA)
Kanülen, 0,3 x 12 mm	B. Braun, Melsungen (D)
Kappa Digitalkamera DX 20 H	Kappa optoelectronics GmbH, Gleichen (D)
Kappa Image Base 2.7.2-Software	Kappa optoelectronics GmbH, Gleichen (D)
Laborzentrifuge 5415 R	Eppendorf, Hamburg (D)
Lichtmikroskop	Nikon GmbH, Düsseldorf (D)
Mastercycler TGradient	Biometra, Göttingen (D)
Mikroliter-Spritze (100 L)	Hamilton, Bonaduz (CH)
Mini-Transblot-Cell	Bio Rad Laboratories GmbH, München (D)
Nano-Drop ND-1000, UV-VIS-Spektrophotometer	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen (D)
Nitrocellulose Transfer Membran	Whatman GmbH, Dassel (D)
Objektträger, Super Frost	Menzel GmbH&CO KG, Braunschweig (D)
Odysey-Scanner	LiCor Bioscience Corp., Lincoln, Nebraska (USA)
Optima TLX-Ultrazentrifuge	Beckmann Coulter, Krefeld (D)
Photospektrometer, SPECTRAFluor Plus	Tecan Group Ltd., Männerdorf (CH)
PowerPac Basic, Spannungsgerät	Bio Rad Laboratories GmbH, München (D)
Präparierbesteck	Aesculap Tuttlingen (D)
QuantityOne-Software	Bio Rad Laboratories GmbH, München (D)
Real Time TaqMan PCR, ABI PRISM 7700 SDS	Applied Biosystems, Warrington (UK)
Rotationsmicrotom RM 2135	Leica Mikrosysteme Vertriebs GmbH, Wetzlar (D)
Rotor TLA-45	Beckmann Coulter, Krefeld (D)
SDS-Software 1.7	Applied Biosystems, Foster City, CA (USA)
Thermomixer 5436	Eppendorf, Hamburg (D)
UV-Meter Gel Doc, Geldokumentationssystem	Bio Rad Laboratories GmbH, München (D)
Waage	Kern & Sohn, Balingen-Frommern (D)
XFluor-Software	Tecan Group Ltd., Männerdorf (CH)

2.1.6 Versuchstiere

Verwendet wurden C57/BL6-Mäuse und COX-2^{-/-}-Mäuse. Alle verwendeten Tiere wurden in einem 12 h-Hell-12 h-Dunkel-Zyklus in IVC-Haltung (*Individually ventilated cages*) gehalten und bekamen Standardfutter und Wasser ad libitum. Die C57/BL6 Mäuse wurden teilweise selbst gezüchtet und teilweise von der Firma Jackson Laboratorien (Bar Harbour, Maine USA) bezogen. Die COX-2 Mauslinien stammten aus eigener Zucht. Die Zuchtpaare wurden freundlicherweise von Robert Langenbach (Nashville, Tennessee, (USA)) zur Verfügung gestellt. Bei der Zuchtplanung musste beachtet werden, dass die COX-2^{-/-}-Weibchen infertil waren, weshalb immer COX-2^{-/-}-Männchen mit COX-2^{+/-}-Weibchen verpaart wurden. Bei behandelten Tieren wurde immer der komplette Wurf gespritzt, da es nicht möglich war die Welpen in den ersten Tagen zu markieren, oder sie zu genotypisieren. Es fanden Versuche statt, die Mäuse mit wasserunlöslichen Stiften am Schwanz zu markieren oder den Schwanz zu kupieren. Es zeigte sich jedoch, dass die Mutter ihre Welpen über Nacht sauber leckte und die kupierten Welpen zeigten eine höhere Letalität in den ersten drei Tagen. Die Genotypisierung der COX-2^{-/-}-Tiere wurde ab dem Tag P18, spätestens bis Tag P28 durchgeführt. Bei den Tieren, die an Tag P21 getötet wurden, fand die Genotypisierung postmortem statt.

Das Tierversuchsvorhaben wurde unter der Registrierungsnummer F95/26 durch die Tierschutzkommission des Regierungspräsidium Darmstadt genehmigt.

2.2 Methoden

2.2.1 Behandlung der Mäuse

Die C57/BL6-Mäuse wurden ab dem Tag P1 mit den entsprechenden Prüfsubstanzen gespritzt, für die ersten sieben Tage s.c. zwischen die Schulterblätter, ab Tag P8 i.p. Das gespritzte Volumen und die Konzentration der unterschiedlichen Prüfsubstanzen richtete sich nach dem Gewicht der Maus und lag folgendem Plan zu Grunde.

Mausalter in Tagen	Gewicht in g	Volumen in μL
1-3	2	10
4-6	3	10
7-8	4	15
9-10	5	15
11-14	6	15
15-18	7	20
19-21	8	20

Die Prüfsubstanzen wurden alle in DMSO gelöst, da einige der Prüfsubstanzen in wässrigen Lösungen in den gewünschten Konzentration ausfielen. Von allen Prüfsubstanzen wurde eine frische Stammlösung hergestellt, die dann entsprechend verdünnt wurde. Gelagert wurden die fertigen Lösungen bei -20°C , diese wurden kurz vor der Injektion aufgetaut. Die Lösungen wurden in eine $100\ \mu\text{L}$ Hamilton Glasspritze, auf die eine $0,3 \times 12\ \text{mm}$ Kanüle aufgesteckt war, aufgezogen und in die mit Ethanol 70% desinfizierte Stelle injiziert.

2.2.2 Präparation der Mäuse

Am postpartalen Tag P21 wurden die Mäuse nach tiefer Narkotisierung mit Isofluran zunächst gewogen und anschließend durch finale Herzpunktion getötet. Aus dem linken Ventrikel wurde durch Herzpunktion Blut entnommen, welches in EDTA-Röhrchen gegeben wurde und anschließend bei $4.000 \times g$ für 3 min zentrifugiert wurde, um Plasma abzutrennen. Dieses wurde für weitere Analysen bei -80°C gelagert. Danach wurde das Herz freipräpariert, entnommen und auf einer Analysenwaage gewogen und dann verworfen. Anschließend erfolgte die Freipräparation und Entnahme der beiden Nieren aus dem Retroperitoneum, die ebenfalls gewogen wurden. Der Kadaver wurde entsprechend entsorgt. Die linke und die rechte Niere wurden quer geteilt und jeweils von jeder Seite eine Hälfte in PFA-Lösung 4% überführt. Die andere Hälfte der rechten Niere wurde in Carnoy-Lösung fixiert, die linke Nierenhälfte in flüssigem Stickstoff schockgefroren, welche schließlich bis zur weiteren Versuchsdurchführung bei -80°C gelagert wurde. Die in 4% PFA fixierten Nierenhälften wurden nach 24 h in 70% Ethanol überführt, die in Carnoy fixierten Nierenhälften in 100% Ethanol.

2.2.3 Paraffinschnitte

Von jeder Versuchsgruppe wurden jeweils die linken in 4% PFA fixierten Nierenhälften verwendet. Sie wurden schrittweise für jeweils 1 h in 80% Ethanol, 95% Ethanol, 100% Ethanol, 100% Ethanol und zweimal Xylol entwässert. Anschließend wurden die Nierenhälften in einer Einbettkassette für weitere 2 h in etwa 60°C heißes flüssiges Paraffin gegeben, danach wurden die Paraffinblöcke gegossen, wobei beachtet werden musste, dass die Nierenhälften auf der Schnittfläche zu liegen kamen. Aus den Paraffinblöcken wurden $4\ \mu\text{m}$ dicke Schnitte unter Kühlung mit Eis an einem Rotationsmikrotom angefertigt, die auf einem etwa 55°C heißen Wasserbad gestreckt und auf einen Objektträger aufgezogen wurden. Die Schnitte wurden bei 37°C in einem Trockenschrank über Nacht getrocknet.

2.2.4 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Für die HE-Färbung wurden die Schnitte vorerst entparaffiniert, indem sie zweimal für 5 min in Xylol und jeweils zweimal für 2 min in Methanol und zweimal 2 min in Wasser getaucht wurden. Die gewässerten Schnitte wurden für 30 s in Hämatoxylin nach Gill gegeben und anschließend für ein bis zwei Minuten unter fließendem Wasser abgespült. Dann wurden die Schnitte mit Eosin für 20 s gegengefärbt und wiederum drei bis viermal mit Leitungswasser abgespült. Um die Färbung zu bewahren, mussten die Schnitte wieder entwässert werden in einer aufsteigenden Alkoholreihe für jeweils 1 min in 50%, 70%, 95% und 100% Ethanol, für 3 min in frischem 100% Ethanol und für 1 min in Xylol. Anschließend wurden die noch mit Xylol benetzten Schnitte mit Entellan möglichst blasenfrei eingedeckelt und getrocknet.

2.2.5 Mikroskopie

Es wurden pro Tier jeweils zwei bis drei Nierenschnitte bei 200-facher Vergrößerung mit dem Lichtmikroskop mikroskopiert und digital fotografiert. Die Schnittebenen lagen etwa 40 bis 50 μm auseinander. Von jedem Schnitt wurden alle Durchmesser der Glomeruli, nicht die der äußeren Blätter der Bowman Kapsel, und deren Abstände zur Nierenkapsel senkrecht zur Nierenoberfläche, mit Hilfe der Image J Software, gemessen (Abb. 2.1). Die Kamera wurde mittels einer 1000 μm Skala geeicht. Aus den ermittelten 160 bis 200 Einzelwerten wurde der mittlere glomeruläre Durchmesser mittels Microsoft Excel 2000 Software bestimmt.

2.2.6 Genotypisierung der Mäuse

Die Mäuse für die Zucht der Knockout-Tiere wurden nach 21 Tagen von der Mutter abgesetzt. Innerhalb der vierten Woche wurden die Tiere mit einer Ohrmarke mit laufender Nummer markiert und es wurde eine 1 bis 2 mm lange Schwanz-Biopsie entnommen.

2.2.7 DNA-Isolation

Die Gewebebiopsien wurden über mindestens 4 Stunden (am besten über Nacht) mit 500 μL Schwanz-Lysepuffer und 5 μL Proteinase K bei 55°C unter Schütteln inkubiert. Nach der Lyse wurden die Gewebereste durch Zentrifugation über 10 min bei 8.500 x g und Raumtemperatur abgetrennt. Die im Überstand enthaltene DNA wurde mittels 500 μL Isopropanol gefällt. Das DNA-Pellet wurde durch kurze Zentrifugation bei ca. 7.300 x g sedimentiert, der Überstand wurde verworfen. Das DNA-Pellet wurde dann in 500 μL Ethanol 70% gewaschen und bei ca. 8.500 x g und 4°C nochmals abzentrifugiert. Der Überstand wurde wiederum verworfen, das Pellet wurde bei Raumtemperatur getrocknet und

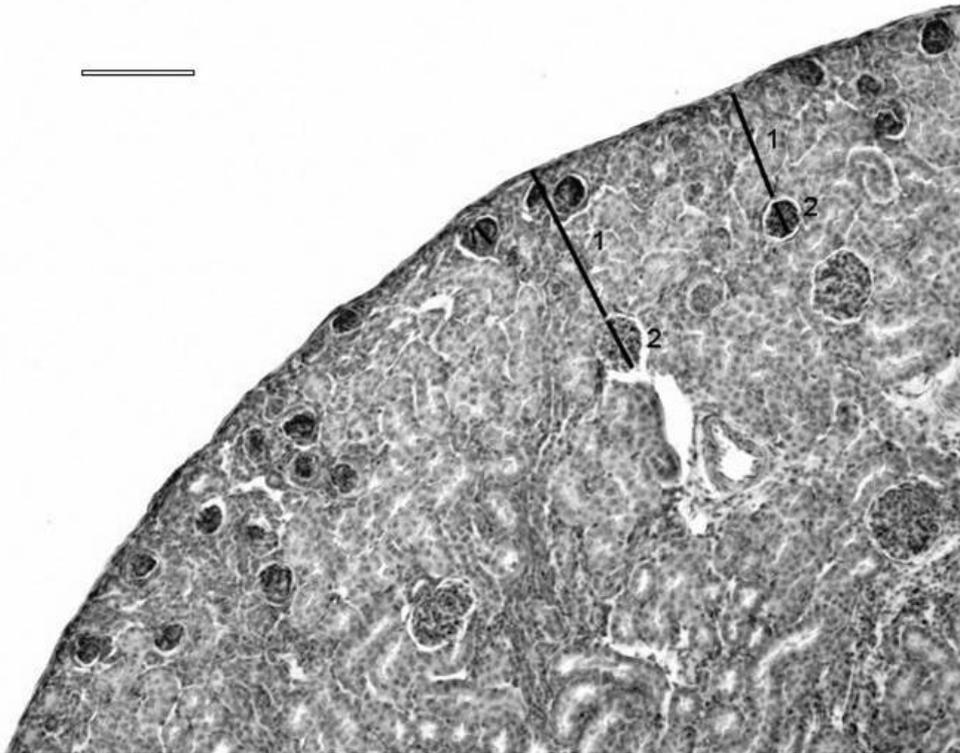


Abbildung 2.1: Ausschnitt der Niere einer COX-2^{-/-} Maus an Tag P21, Balken entspr. 100 μm , 200 x vergrößert, HE-Färbung. Dargestellt sind Beispiele für die Messstrecken der Kapseldistanzen (Markierungen 1) und der Durchmesser der Glomeruli (Markierungen 2), jeweils senkrecht zur Kapsel.

anschließend bei 55°C für 1 bis 2 h unter Schütteln in 250 μL TE-Puffer für die weitere Verwendung gelöst. Die DNA-Lösung konnte direkt eingesetzt oder bei -20°C gelagert werden.

2.2.8 Qualitative Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die PCR dient der gezielten Amplifizierung von kurzen definierten DNA-Fragmenten. Es wurde stets auf Eis gearbeitet. 2 μL der DNA-Lösung wurde in PCR-Reaktionsgefäße vorgelegt. Anschließend wurde je nach Probenanzahl ein Mastermix hergestellt. Auf die DNA-Lösung kamen dann jeweils 18 μL des Mastermixes. Die Amplifizierung erfolgte in einem Thermocycler mit einer Vorlaufzeit von 5 min bei 94°C. Danach folgten 35 Zyklen mit 94°C für 30 s zur Denaturierung, 56°C für 30 s für die Primerhybridisierung und 72°C für 30 s zur Elongation. In einer Nachlaufzeit von 5 min bei 72°C wurde die Reaktion abgestoppt, anschließend wurde der Heizblock auf 4°C abgekühlt.

2.2.9 Gelelektrophorese

Für die Gelelektrophorese wurde ein 1,5% Agarosegel in der Gelkammer gegossen, in dem die Agarose mit 1x TAE-Puffer vermischt wurde und in der Mikrowelle für 1-2 min bei 600 W gekocht wurde. Die Proben wurden mit 4 μL 6x Probenpuffer versetzt. Als Standard diente eine 100 bp-Leiter, von der 10 μL in die erste Tasche pipettiert wurden, in die übrigen Taschen kamen 15 μL der Proben, die dann

bei 80 V und 100 mA für etwa 1 h elektrophoretisch aufgetrennt wurden. Anschließend wurde das Gel unter UV-Licht auf einem Geldokumentations-System fotografiert. Anhand der Fragmentgröße wurde der Genotyp des Tieres bestimmt werden.

2.2.10 RNA-Isolation mit RNeasy Mini Kit für quantitative TaqMan PCR

Die RNA Aufbereitung aus Nierengewebe mittels RNeasy Mini Kit erfolgte nach Herstellerangaben. Für die Isolation von RNA aus Nierengewebe wurde schockgefrorenes, bei -80°C gelagertes Gewebe verwendet. Für das RNeasy Mini Kit sollte nicht mehr als 30 mg Gewebe eingesetzt werden, weshalb das Gewebe vor der Verarbeitung gewogen und entsprechend zurecht geschnitten wurde. Das Gewebe wurde mit 300 bis 600 μL RLT-Puffer ($+\beta$ -Mercaptoethanol) versetzt und mittels Potter homogenisiert. Das Gewebehomogenisat wurde bei Raumtemperatur für 3 min bei ca. $7.300 \times g$ zentrifugiert. Der Überstand wurde mit 70% Ethanol im Verhältnis 1:1 mit der Pipette gut gemischt. Das Gemisch aus Überstand und Ethanol wurde auf eine RNeasy Mini Säule gegeben und bei Raumtemperatur für 15 s bei $5.040 \times g$ abzentrifugiert. Die RNA war nun auf der Säule gebunden, weshalb der Durchfluss immer verworfen werden konnte. Es folgte ein Waschschriff und ein DNaseverdau mittels einer RNase-freien DNase-Lösung, ebenfalls genau nach Herstellerangaben. Nun wurde die Säule wiederum mit jeweils 500 μL RPE-Puffer zweimal gewaschen. Bei dem letzten Waschschriff wurde der Durchfluss für 2 min bei $5.040 \times g$ und Raumtemperatur abzentrifugiert, um die Säule zu trocknen. Nun konnte die RNA von der Säule gewaschen werden, indem 30 bis 50 μL RNase-freies H_2O auf die Säule gegeben wurde und für 1 min bei $8.500 \times g$ und Raumtemperatur in ein 1,5 mL Reaktionsgefäß zentrifugiert wurde. Der Durchfluss enthielt eine RNA-Lösung und konnte nach Bestimmung des RNA-Gehaltes direkt eingesetzt werden oder bei -20°C gelagert werden. Der RNA-Gehalt dieser Lösung wurde mittels Nano-Drop UV-VIS-Spektrophotometer bestimmt.

2.2.11 Reverse Transkription

Zu 11 μL der RNA-Lösung wurde Oligo dT-Primer zu gegeben, der an dem Poly A-Schwanz der mRNA hybridisierte. Der Ansatz wurde bei 70°C für 10 min inkubiert. Anschließend wurde er auf Eis abgekühlt und kurz abzentrifugiert. Nun wurden 8 μL des Reverse Transkription Mastermix dazupipettiert und für die Anlagerung der Reversen Transkriptase für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Umschreibung der RNA in cDNA erfolgte dann bei einer Temperatur von 42°C für 50 min. Zur Inaktivierung der Reaktion wurde der Ansatz für 5 min auf 70°C erhitzt. Die cDNA wurde als Matrizen-Strang (Template) in der PCR eingesetzt werden und für spätere Analysen bei -20°C aufbewahrt werden.

2.2.12 TaqMan PCR

Die Quantifizierung der COX-2-mRNA in den Nieren erfolgte über quantitative TaqMan-RT-PCR an einem ABI Prism 7700 Sequence Detection System (ABI Prism 7700 SDS) mit dem Programm Sequence Detector, Version 1.7. Die Messung erfolgte in einer 3-fach-Bestimmung. 18S-rRNA diente bei der Quantifizierung als interner Standard. Das Prinzip der quantitativen TaqMan-RT-PCR beruht auf der Detektion der Fluoreszenz und erfolgt nach jedem PCR-Zyklus. In diesem Versuch erfolgte die Markierung von COX-2-cDNA durch SYBR-Green und von 18S-rRNA durch fluoreszenzspezifische Sonden. Das emittierte Fluoreszenzsignal ist zu der Konzentration der amplifizierten DNA proportional. Die Messungen wurden mit speziellen kommerziell erhältlichen Absolute QPCR Mix-Kits nach Herstellerangaben durchgeführt. Für die COX-2-Expressionsanalyse diente als Fluoreszenzfarbstoff SYBR-Green, der in dem Mix enthalten war (Absolute QPCR SYBR Mix). Für die quantitative Analyse der 18S-rRNA wurde ein Mix aus PDAR (predeveloped assay reagent) verwendet, der als Fluoreszenzfarbstoff VIC enthalten hatte (Absolute QPCR ROX Mix). Die PCR-Bedingungen wurden wie folgt gewählt: Die Initialisierung der Taq-DNA-Polymerase erfolgte bei 95°C für 15 min; die Denaturierung wurde bei 95°C für 15 s durchgeführt und das Primer-Annealing, sowie Extension erfolgte bei 60°C für 1 min. Dieser Zwei-Phasen-Zyklus wurde 40 Mal durchlaufen, bis die Reaktion durch Abkühlen auf 4°C beendet wurde. Die Berechnung der relativen mRNA-Menge erfolgte nach der komparativen C_T -Methode. Dabei wird ein Schwellenwert festgelegt (C_T -Wert), bei dem die DNA-Amplifikation sich in der exponentiellen Phase befindet („Fit-Point“-Methode). Der Amplifizierungszyklus, bei dem dieser Schwellenwert erreicht wird, diente als Grundlage für die Berechnung der relativen mRNA-Mengen. Der C_T -Wert für die COX-Signale wurde mit dem 18S-rRNA C_T -Wert korreliert, um Schwankungen in der Ausgangskonzentration der eingesetzten RNA auszugleichen (Bildung der Differenz ΔC_T aus C_T -Werten für COX-2 und 18S-rRNA) (siehe Abb. 2.2). Der Gehalt an COX-2-mRNA in den Nieren unterschiedlich alter und unterschiedlich behandelter Tiere wurde auf den Gehalt in Nieren an Tag P21, von unbehandelten Tieren, (als 1 festgelegt) bezogen. Die erhaltenen $\Delta\Delta C_T$ -Werte wurden pro Gruppe gemittelt und die relative DNA-Konzentration errechnet. Die DNA-Menge ließ sich näherungsweise über den folgenden mathematischen Zusammenhang berechnen:

$$\text{relative COX-2 Expression} = 2^{-\Delta\Delta C_T}.$$

Zur Herleitung der Formel und zur genauen Erklärung der komparativen C_T -Methode sei auf das Handbuch von ABI Prism 7700 SDS verwiesen.

2.2.13 Proteinpräparation

Bei der Präparation von Proteinen wurde immer auf Eis gearbeitet. Das Gewebe wurde in ein 1,5 mL Reaktionsgefäß zusammen mit 200 μ L Tris-Puffer und Pefa Block gegeben und gut gepottert. An-

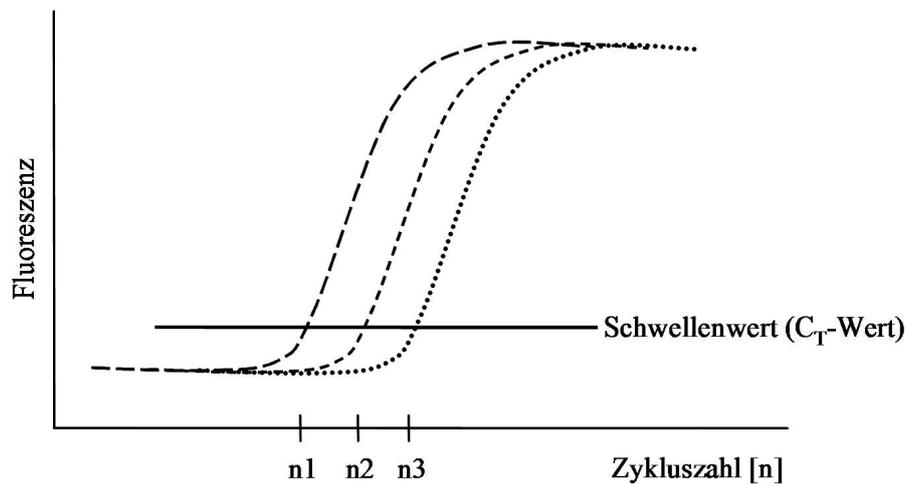


Abbildung 2.2: PCR-Quantifizierung mittels der „Fit-Point“-Methode des TaqMan-Gerätes. Zur Berechnung der in den Proben enthaltenen relativen Mengen an COX-2-mRNA wurde die Amplifizierung von COX-2 und die des Referenz-Gen 18S-rRNA gemessen und mit der „Fit-Point“-Methode des TaqMan-Gerätes analysiert. Dabei wird eine horizontale Linie in die exponentielle Phase des gemessenen Fluoreszenzsignals gelegt, so dass an den Schnittpunkten der Fluoreszenzsignale verschiedener Proben (C_T -Werte) die gleiche Fluoreszenzintensität und somit die gleiche momentane DNA-Menge vorliegt, welche allerdings bei einer unterschiedlichen Anzahl von Zyklen erreicht wurde.

schließlich wurde das Homogenisat mit $1.000 \times g$ bei 4°C für 30 min zentrifugiert, um die groben Reste zu sedimentieren. Der Überstand wurde in spezielle Ultrazentrifugen-Gefäße gegeben und auf $500 \mu\text{L}$ mit Tris Puffer aufgefüllt. Dieser wurde bei $80.640 \times g$ in einer Ultrazentrifuge für 1 h bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand enthielt die Proteine des Zytosols und wurde abgenommen und bei -80°C gelagert. Das Pellet wurde in $200 \mu\text{L}$ Membranlyse-Puffer mit dem Potter solubilisiert und für 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde das Homogenisat bei $80.640 \times g$ in der Ultrazentrifuge für 1 h bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand enthielt die Proteine der Membranfraktion und wurde ebenfalls bei -80°C gelagert.

2.2.14 Proteinbestimmung

Die Proteinbestimmung wurde mit BCA (*bicinchoninic acid*) Reagenz nach Smith *et al.* 1985 durchgeführt. Hierbei werden die Proteinkonzentrationen in einer unsterilen Mikrotiterplatte (96 Wells) photometrisch gemessen und mit einem Albuminstandard verglichen. Die Methode beruht auf dem Prinzip der Biuret-Reaktion. In alkalischer Lösung werden Cu^{2+} -Ionen abhängig von der Proteinkonzentration zu Cu^+ reduziert, welches mit dem Natriumsalz der Bicinchoninsäure ein violettees Reaktionsprodukt ergibt, dessen Absorptionsmaximum bei 562 nm gemessen wurde.

Zur Proteinbestimmung wurde immer eine 3-fach-Bestimmung durchgeführt. In die Wells der Mikrotiterplatte wurde nach folgendem Schema pipettiert.

	1	2	3	4	5
A	9 μL H ₂ O + 1 μL Puffer	9 μL H ₂ O + 1 μL Puffer	9 μL H ₂ O + 1 μL Probe 1	9 μL H ₂ O + 1 μL Probe 1	9 μL H ₂ O + 1 μL Probe 1
B	9 μL H ₂ O + 1 μL BSAr	9 μL H ₂ O + 1 μL BSA	9 μL H ₂ O + 1 μL Probe 2	9 μL H ₂ O + 1 μL Probe 2	9 μL H ₂ O + 1 μL Probe 2
C	8 μL H ₂ O + 2 μL BSA	8 μL H ₂ O + 2 μL BSA	9 μL H ₂ O + 1 μL Probe 3	9 μL H ₂ O + 1 μL Probe 3	9 μL H ₂ O + 1 μL Probe 3
D	7 μL H ₂ O + 3 μL BSA	7 μL H ₂ O + 3 μL BSA	9 μL H ₂ O + 1 μL Probe 4	9 μL H ₂ O + 1 μL Probe 4	9 μL H ₂ O + 1 μL Probe 4
E	6 μL H ₂ O + 4 μL BSA	6 μL H ₂ O + 4 μL BSA	9 μL H ₂ O + 1 μL Probe 5	9 μL H ₂ O + 1 μL Probe 5	9 μL H ₂ O + 1 μL Probe 5
F	5 μL H ₂ O + 5 μL BSA	5 μL H ₂ O + 5 μL BSA	9 μL H ₂ O + 1 μL Probe 6	9 μL H ₂ O + 1 μL Probe 6	9 μL H ₂ O + 1 μL Probe 6
G			9 μL H ₂ O + 1 μL Probe 7	9 μL H ₂ O + 1 μL Probe 7	9 μL H ₂ O + 1 μL Probe 7
H			9 μL H ₂ O + 1 μL Probe 8	9 μL H ₂ O + 1 μL Probe 8	9 μL H ₂ O + 1 μL Probe 8

Anschließend wurde auf jedes Well 200 μL der Arbeitslösung, die frisch angesetzt wurde, bestehend aus 50:1 Teilen Reagenz A zu Reagenz B, pipettiert. Reagenz A enthält BCA, Na₂CO₃·H₂O, Natriumtartrat, NaOH und NaHCO₃ in ddH₂O. Reagenz B enthält CuSO₄·H₂O in ddH₂O. Der Versuchsansatz wurde bei 37°C für 30 min inkubiert und anschließend mit einem Spektralphotometer (SPECTRAFluor Plus) bei einer Wellenlänge von 562 nm gemessen. Als Albumin-Standard diente eine BSA-Verdünnungsreihe mit einer Ausgangskonzentration von 1 mg/mL. Die Daten wurden mit der XFluor-Software ausgewertet und die mittlere Proteinkonzentration ermittelt.

2.2.15 SDS-PAGE-Minigel

Je nach Proteingröße wurde das Gel mit unterschiedlicher Polyacrylamidkonzentration gegossen. Exemplarisch ist in Kapitel 2.1.3 ein 10% Gel beschrieben, da damit Proteine von ca. 30 bis 90 kDa gut aufgetrennt werden konnten und die COX-2 ein apparentes Molekulargewicht von etwa 70 kDa aufweist. Die Reagenzien wurden wie oben beschrieben zunächst für das Trenngel zusammen pipettiert, anschließend in die Gießvorrichtung gegeben und einige Mikroliter Isopropanol auf die Oberfläche gegeben, um eine glatte Fläche zu erhalten und um die Blasenbildung zu verhindern. Wenn das Trenngel nach ca. 30 min polymerisiert war, konnte das restliche Isopropanol abgeschüttet werden. Nun konnten die Reagenzien für das Sammelgel pipettiert werden und auf das polymerisierte Trenngel gegeben werden, sowie die Kämme eingesetzt werden.

2.2.16 Western Blot

Der 4 x Lämmli-Puffer wurde vor der Verwendung auf dem Schüttler auf 95°C erhitzt. Anschließend wurde β -Mercaptoethanol frisch im Verhältnis 1:5 dazugeben und gut gemischt. Es wurden je 50 μg Protein in ein Reaktionsgefäß vorgelegt und die 4 x Lämmli-Puffer/ β -Mercaptoethanol-Mischung in einem Verhältnis von 1:4 zur Probe dazugegeben. Die Proteinlösung wurde bei 95°C für 5 min auf dem Schüttler denaturiert. Das SDS in dem 4 x Lämmli-Puffer lagerte sich an die Proteine, so dass diese später isoelektrisch nur nach ihrem Gewicht aufgetrennt werden konnten. Anschließend wurden die vorbereiteten Proben komplett auf das SDS-PAGE Minigel aufgetragen. Die Proteine wurden im Sammelgel in 1 x SDS-Laufpuffer bei 80 V und 150 mA für 30 min gesammelt und anschließend bei 120 V und 150 mA für ca. 1 h bis die Lauffront am unteren Rand des Gels war, elektrophoretisch aufgetrennt. Währenddessen wurden für den Proteintransfer zwei Stücke Filterpapier und ein Stück Nitrocellulosemembran der Größe 9 x 6,5 cm zurecht geschnitten. Dabei musste beachtet werden, dass die Membran nicht mit bloßer Hand angefasst werden durfte, da sonst auf der Membran durch die Proteine auf der Haut Artefakte entstanden wären. Für den Proteintransfer von dem Gel auf die Membran war der Aufbau gemäß Tabelle 2.8. Dabei musste man darauf achten, dass keine Luftblasen

Tabelle 2.8: Proteintransfer von dem Gel auf die Membran

Kathode	Transfer-Richtung ↓
Schwarzes Gitter	
Schwamm in Western Blot-Puffer getränkt	
Filterpapier in Western Blot-Puffer getränkt	
SDS-PAGE Minigel	
Nitrocellulosemembran	
Filterpapier in Western Blot-Puffer getränkt	
Schwamm in Western Blot-Puffer getränkt	
Weißes Gitter	
Anode	

zwischen Gel und Membran waren. In der Blotting-Kammer wurde in Western Blot-Puffer bei 100 V und 150 mA unter zusätzlicher Kühlung mittels eines Kühllakkus für eine Stunde elektrophoretisch transferiert.

Nach dem Proteintransfer wurde die Membran zur Kontrolle mit Ponceau-Lösung S 3% gefärbt. Die Proteinbanden wurden damit unspezifisch angefärbt, um eine Erfolgskontrolle für die PAGE, sowie den Proteintransfer zu haben. Die Ponceau-Lösung wurde mit ddH₂O abgewaschen und die Membran anschließend für einige Minuten in PBS entfärbt. Um die unbesetzten Stellen auf der Membran

zu besetzen, wurde die Membran für 1 h bis 12 h in einer Milchpulverlösung (PBS) geblockt. Für die Inkubation mit dem Primär-Antikörper wurde eine Milchpulverlösung (PBST) hergestellt und je nach Antikörper im Verhältnis 1:100 bis 1:1.000 Antikörper dazugegeben. Die Membran wurde dann über Nacht mit dem Primär-Antikörper unter Bewegung bei 4°C inkubiert. Anschließend wurde sie dreimal in PBST gewaschen, erst kurz, für 5 min und für 10 min. Danach erfolgte die Inkubation mit dem Sekundär-Antikörper für 1 h unter Bewegung bei Raumtemperatur in einer Antikörper-Milchpulverlösung (PBST), die Antikörper im Verhältnis 1:10.000-1:20.000 enthielt, unter Ausschluss von Licht, da es sich um einen mit fluorochrom-gekoppelten Antikörper handelte, deren Farbstoff im Licht zerfallen wäre. Die Membran wurde wiederum in PBST gewaschen, zunächst kurz, für 5 min und für 10 min. Anschließend wurde die Membran je nach Farbstoff des Sekundär-Antikörpers bei einer Wellenlänge von 680 oder 800 nm auf einem Odyseycanner gescannt.

Da bei zwei verschiedenen Wellenlängen gemessen werden konnte, war es möglich auf einer Membran zwei verschieden Proteine in unterschiedlichen Farben darzustellen. Wurde bei der ersten Inkubation ein Sekundär-Antikörper gewählt, der an eine Farbstoff der Wellenlänge 680 nm gekoppelt war, konnte der zweite Sekundär-Antikörper mit einem Farbstoff von 800 nm gewählt werden. Zu beachten war hierbei allerdings, dass die beiden Primär-Antikörper aus unterschiedlichen Wirtstieren stammen mussten.

2.3 Statistik

Die Berechnungen erfolgten mit den Softwareprogrammen Microsoft Excel 2000 und GraphPad Prism 4. Es wurden etwa zwei bis drei Nierenschnitten einer Maus mikroskopiert und ausgewertet, aus den je Schnitt etwa 200 gemessenen Durchmessern der Glomeruli, sowie den Abständen zur Kapsel, wurde zunächst in Microsoft Excel 2000 ein Mittelwert gebildet. Anschließend wurden die Mittelwerte der einzelnen Mäuse einer Versuchsgruppe in GraphPad Prism 4 berechnet. Untersucht wurden aus jeder Versuchsgruppe drei Tiere. Die Nierenquotienten, der Anteil der Glomeruli im Rindenbereich von 58 μm und die kortikale Dicke wurden in Microsoft Excel 2000 aus den Mittelwerten eines Tieres ausgerechnet, in GraphPad Prism 4 wurden dann die Mittelwerte einer Versuchsgruppe gebildet. Die Versuchsergebnisse sind als Mittelwert \pm Standardabweichung vom Mittelwert (SEM) dargestellt, sofern nicht anders angegeben. Die Signifikanz p wurde bei den zwei-Gruppen-Vergleichen mittels ungepaartem t-Test errechnet. Bei den Kinetik-Versuchen erfolgte die Berechnung der Signifikanz mittels univarianter Analyse der Varianz (One-way-ANOVA). Für den Vergleich der Gruppen wurde zur Analyse der Signifikanz p ein Post-Test unter Verwendung einer Bonferroni α -Korrektur durchgeführt, dabei wurde bei der Kinetik mit unbehandelten Tieren jeweils nur mit Tag P21 verglichen und bei der Kinetik mit behandelten Tieren alle Gruppen untereinander (multiple comparison). Vorhandenen Si-

gnifikanzen p sind bei zwei Gruppen-Vergleichen mit * und bei mehreren Gruppen mit einer Klammer und * dargestellt. Die Signifikanz p wurde in den graphischen Darstellungen wie folgt gekennzeichnet: *p < 0,05, **p < 0,01 und ***p < 0,001. Für die Verteilungskurven der Glomeruli wurden die Durchmesser eines Tieres nach der Größe sortiert und die relative Häufigkeit der Durchmesser in 5 μm Schritten bestimmt. Anschließend wurden die gemittelten relativen Häufigkeiten auf dem y-Achsenabschnitt und die Durchmesser der Glomeruli in 5 μm Intervallen auf dem x-Achsenabschnitt aufgetragen.

Kapitel 3

Ergebnisse

Aus dem Körpergewicht und dem Gewicht der beiden Nieren wurde der Quotient Nierengewicht zu Körpergewicht $\times 1000$ gebildet, des weiteren wurden die Schnitte der Nieren mit Hilfe der Image J Software histomorphologisch untersucht. Es wurde jeweils der Durchmesser der Glomeruli, senkrecht zur Kapsel und die Distanz der Bowmanmembran zur Kapsel gemessen. Aus den resultierenden Werten wurde der mittlere Durchmesser, die mittlere kortikale Dicke, der Anteil der Glomeruli im Rindenbereich von $58 \mu\text{m}$ von der Kapsel gemessen, sowie die relative Häufigkeit der Durchmesser der Glomeruli bestimmt. Die gemessenen Durchmesser wurden in einen Graphen mit den Durchmessern auf dem x-Achsenabschnitt und die relative Häufigkeit auf dem y-Achsenabschnitt aufgetragen. Die mittlere kortikale Dicke wurde aus den Mittelwerten der Distanzen zur Kapsel im Bereich der Summe des mittleren Durchmessers und der kleinsten Distanz eines Glomerulums zur Kapsel bestimmt.

3.1 C57/BL6-Maus, unbehandelt versus behandelt mit DMSO

Das Ziel dieser Versuchsreihe war nachzuweisen, ob die alleinige Gabe von DMSO, das als Lösungsmittel aller verabreichten Substanzen verwendet wurde, auf die Nierenentwicklung bei Wildtyp-Mäusen einen Einfluss hat.

Zwischen den unbehandelten Wildtyp-Mäusen und über 21 Tage mit DMSO behandelten Tieren konnte in allen erhobenen Parametern kein signifikanter Unterschied beobachtet werden. Im folgenden wurden die Werte der Tiere die mit DMSO über 21 Tage behandelt wurden, als Referenzgruppe herangezogen. Der Nierenquotient lag bei den unbehandelten Mäusen bei $17,53 \pm 0,6$ im Vergleich zu $17,48 \pm 0,6$ bei den mit DMSO behandelten Mäusen ($p = 0,95$, $n = 3$). Der mittlere Durchmesser der Glomeruli betrug $(41,23 \pm 0,7) \mu\text{m}$ versus $(41,18 \pm 1,5) \mu\text{m}$ bei den mit DMSO behandelten Mäusen ($p = 0,9761$, $n = 3$). Die mittlere kortikale Dicke lag bei $(43,6 \pm 1,0) \mu\text{m}$ im Vergleich zu $(45,41 \pm 2,0) \mu\text{m}$ ($p = 0,475$, $n = 3$). Der Anteil der Glomeruli im Rindenbereich von $58 \mu\text{m}$ lag bei $(11,62 \pm 0,9)\%$ im Gegensatz zu $(13,45 \pm 1,1)\%$ ($p = 0,2749$, $n = 3$) (vgl. Abb. 3.1 - 3.6).

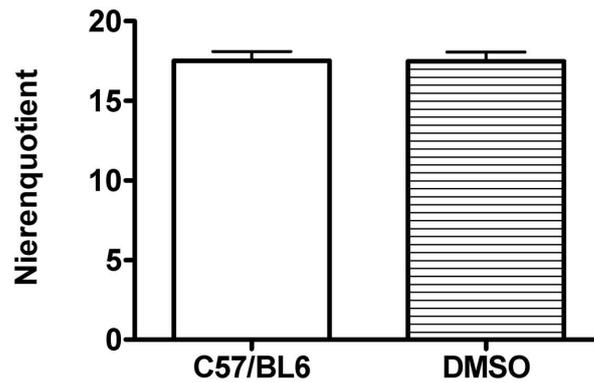


Abbildung 3.1: Nierenquotienten an Tag P21 von C57/BL6-Mäusen, unbehandelt (C57/BL6) und behandelt mit DMSO über 21 Tage (DMSO). Es zeigt sich kein Unterschied zwischen beiden Gruppen. Dargestellt ist der Nierenquotient \pm SEM. ($p > 0,05$, $n = 3$)

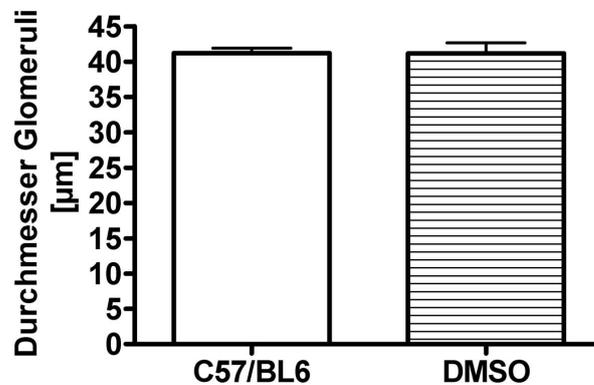


Abbildung 3.2: Die mittleren Durchmesser der Glomeruli von Nieren aus C57/BL6-Mäusen, unbehandelt (C57/BL6) und behandelt mit DMSO über 21 Tage (DMSO) am postpartalen Tag P21. Es zeigte sich kein Unterschied zwischen beiden Gruppen. Dargestellt sind die Durchmesser \pm SEM. ($p > 0,05$, $n = 3$)

Das Maximum der Verteilungskurve lag bei beiden Gruppen bei etwa $35 \mu\text{m}$, der Verlauf der Verteilungskurve der unbehandelten Tiere war etwas flacher, als bei den mit DMSO behandelten Tieren, jedoch ergab sich kein signifikanter Unterschied bei den relativen Häufigkeiten der unterschiedlichen Durchmesser-Gruppierungen (vgl. Abb. 3.7). COX-2^{+/-}- und COX-2^{+/+}-Mäuse zeigten wie die mit DMSO behandelten C57/BL6-Mäuse keine Veränderungen in den hier erhobenen Parametern (Daten nicht dargestellt). Im folgenden werden die mit DMSO behandelten Mäuse als Referenzgruppe bezeichnet.

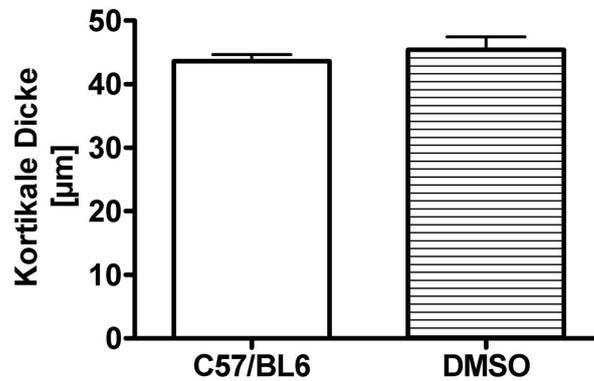


Abbildung 3.3: Die kortikale Dicke von Nieren aus C57/BL6-Mäusen, unbehandelt (C57/BL6) und behandelt mit DMSO über 21 Tage (DMSO) an Tag P21. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen beiden Gruppen. Dargestellt sind die kortikalen Dicken \pm SEM. ($p > 0,05$, $n = 3$)

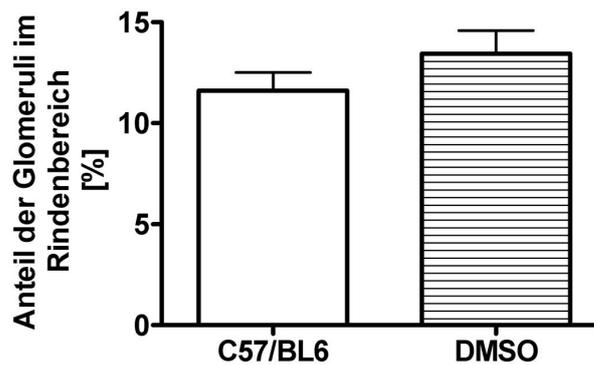


Abbildung 3.4: Die Anteile der Glomeruli im Rindenbereich innerhalb $58 \mu\text{m}$, dargestellt von Nieren aus C57/BL6-Mäusen, unbehandelt (C57/BL6) und behandelt mit DMSO über 21 Tage (DMSO) an Tag P21. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen beiden Gruppen. Dargestellt ist der prozentuale Anteil der Glomeruli im Rindenbereich von $58 \mu\text{m} \pm$ SEM. ($p > 0,05$, $n = 3$)

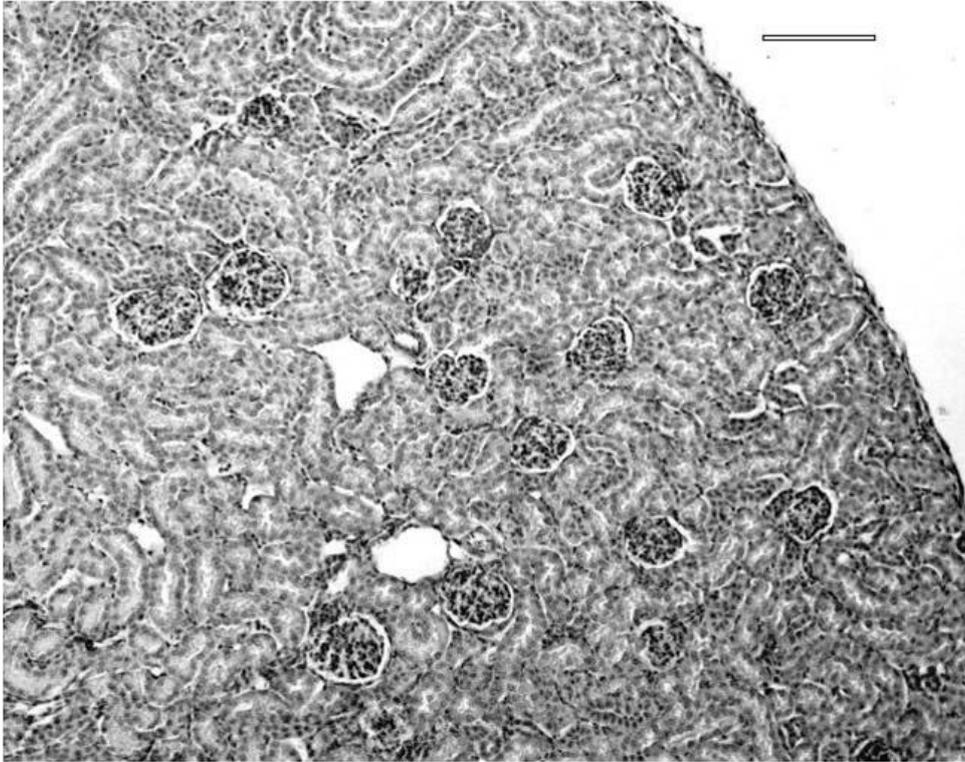


Abbildung 3.5: Ausschnitt der Niere einer unbehandelten C57/BL6-Maus an Tag P21, Balken entspr. 100 μm , 200 x vergrößert, HE-Färbung.



Abbildung 3.6: Ausschnitt der Niere einer C57/BL6-Maus, behandelt mit DMSO über 21 Tage an Tag P21, Balken entspr. 100 μm , 200 x vergrößert, HE-Färbung.

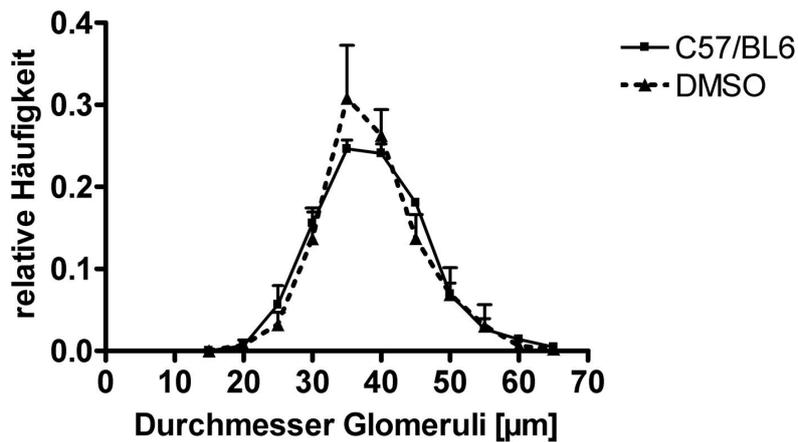


Abbildung 3.7: Verteilungskurve der relativen Häufigkeiten der Glomeruli \pm SEM von Nieren aus C57/BL6-Mäusen vs. C57/BL6-Mäuse, die mit DMSO über 21 Tage behandelt wurden (DMSO) am postpartalen Tag P21.

3.2 COX-2^{-/-}-Mäuse

Die COX-2^{-/-}-Mäuse zeigten in allen erhobenen Parametern signifikante Veränderungen gegenüber der Referenzgruppe. Der Nierenquotient lag an Tag P21 bei COX-2^{-/-} Mäusen im Mittel bei $9,217 \pm 0,2$ versus $17,48 \pm 0,6$ bei der Referenzgruppe ($p < 0,001$, $n = 3$). Der mittlere Durchmesser lag bei den COX-2^{-/-}-Mäusen bei $(23,55 \pm 0,6) \mu\text{m}$ im Vergleich zu $(41,18 \pm 1,5) \mu\text{m}$ bei der Referenzgruppe ($p < 0,001$, $n = 3$). Auch die kortikale Dicke war mit $(10,73 \pm 0,3) \mu\text{m}$ deutlich dünner als die der Referenzgruppe mit $(45,41 \pm 2,0) \mu\text{m}$ ($p < 0,001$, $n = 3$). Der Anteil der Glomeruli im Bereich von $58 \mu\text{m}$ gemessen senkrecht zur Kapsel lag bei $(68,51 \pm 2,0)\%$ im Gegensatz zur Referenzgruppe bei $(13,45 \pm 1,1)\%$ ($p < 0,001$, $n = 3$) (vgl. Abb. 3.8 - 3.12).

Das Maximum des Graphen ist bei den COX-2^{-/-}-Mäusen deutlich nach links verschoben und liegt bei etwa $15 \mu\text{m}$ versus etwa $35 \mu\text{m}$ bei der Referenzgruppe (vgl. Abb. 3.13). Der Anteil hypertrophierter Glomeruli ($>55 \mu\text{m}$) ist bei den COX-2^{-/-}-Mäusen im Vergleich zur Referenzgruppe größer.

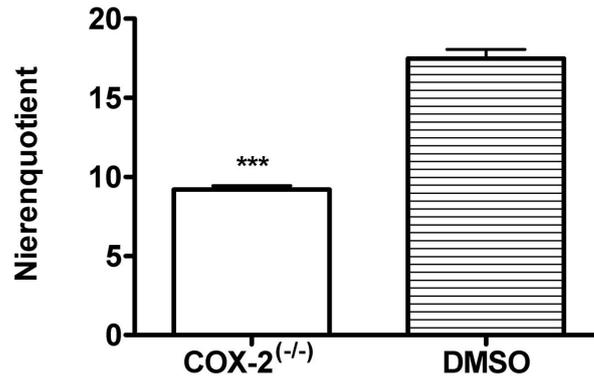


Abbildung 3.8: Nierenquotienten an Tag P21 von COX-2^{-/-}-Mäusen und C57/BL6-Mäusen behandelt mit DMSO über 21 Tage. Es zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen beiden Gruppen. Dargestellt ist der Nierenquotient \pm SEM. (***) $p < 0,001$, $n = 3$)

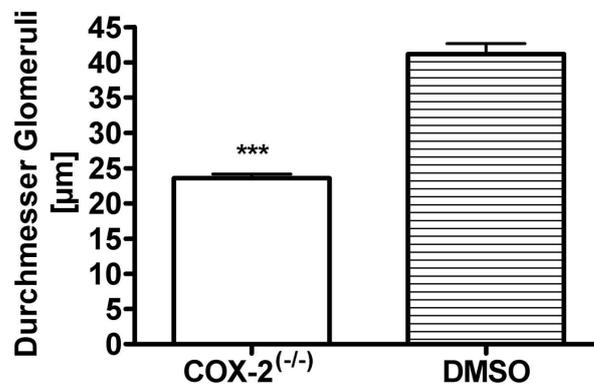


Abbildung 3.9: Die mittleren Durchmesser der Glomeruli von Nieren aus COX-2^{-/-}-Mäusen und C57/BL6-Mäusen, die mit DMSO über 21 Tage behandelt wurden, jeweils am postpartalen Tag P21 entnommen. Es zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen beiden Gruppen. Dargestellt sind die Durchmesser \pm SEM. (***) $p < 0,001$, $n = 3$)

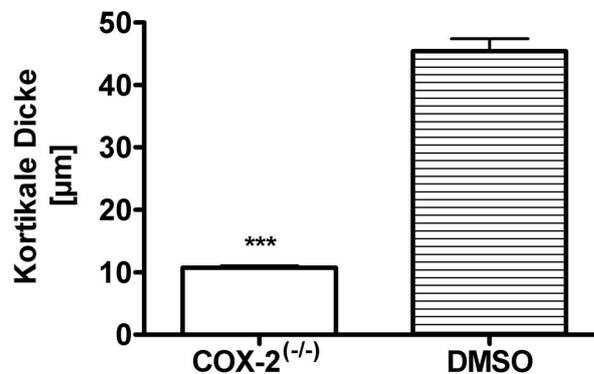


Abbildung 3.10: Die kortikale Dicke von Nieren aus COX-2^{-/-}-Mäusen und C57/BL6-Mäusen, die über 21 Tage mit DMSO nach bekanntem Schema behandelt wurden an Tag P21. Es zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen beiden Gruppen. Dargestellt sind die kortikalen Dicken \pm SEM. (***) $p < 0,001$, $n = 3$)

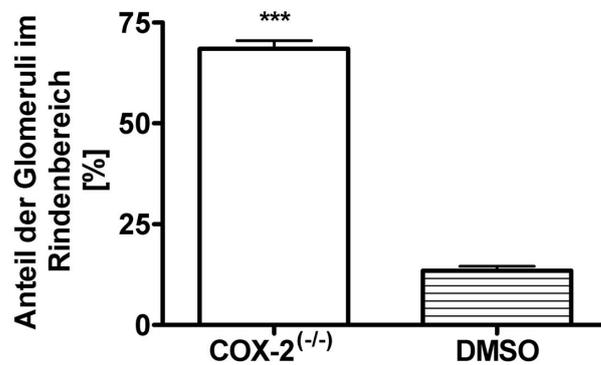


Abbildung 3.11: Darstellung der Anteile der Glomeruli im Rindbereich innerhalb 58 μm von COX-2^{-/-}-Mäusen und C57/BL6-Mäusen mit DMSO-Behandlung über 21 Tage an Tag P21. Es zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen beiden Gruppen. Dargestellt ist der prozentuale Anteil der Glomeruli im Rindbereich von 58 $\mu\text{m} \pm \text{SEM}$. (***) $p < 0,001$, $n = 3$)

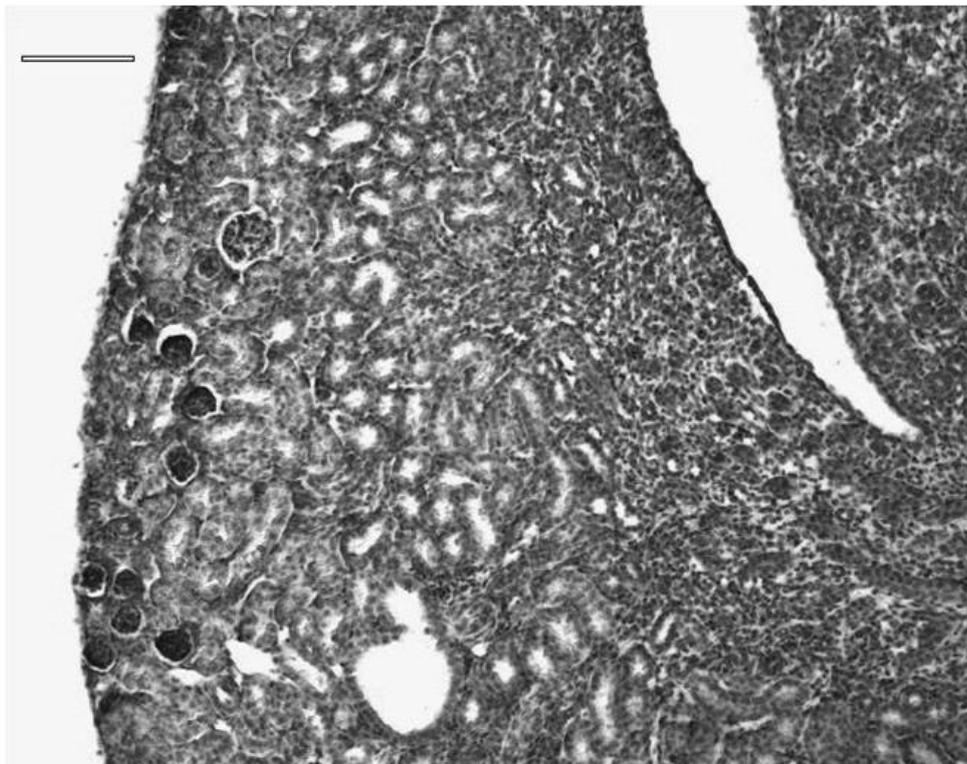


Abbildung 3.12: Ausschnitt der Niere einer COX-2^{-/-}-Maus an Tag P21, Balken entspr. 100 μm , 200 x vergrößert, HE-Färbung. Zu sehen sind die zu kleinen, dicht gelagerten Glomeruli im subkapsulären Bereich, sowie eine Zyste im unteren Bildbereich.

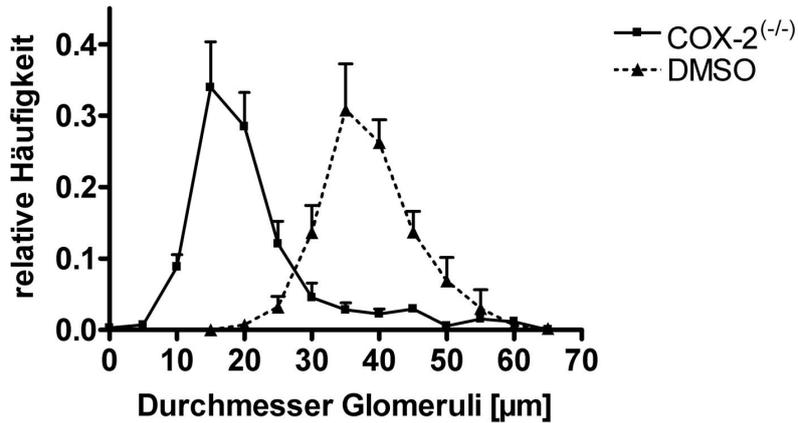


Abbildung 3.13: Verteilungskurve der relativen Häufigkeiten der Glomeruli \pm SEM an Tag P21 von Nieren aus COX-2^{-/-}-Mäusen und C57/BL6-Mäusen, die mit DMSO über 21 Tage behandelt wurden.

3.3 Selektive COX-2-Inhibitoren

In den kommenden Versuchsreihen sollten die selektiven experimentellen COX-2-Inhibitoren SC-236 und SC-791, die Coxibe und die klassischen NSAIDs Diclofenac und Naproxen, der selektive experimentelle COX-1-Inhibitor SC-560 und das Derivat des Celecoxibs, Dimethylcelecoxib (DMC) miteinander verglichen werden und auf die Wirkungen hinsichtlich der Nephrogenese bei Mäusen mit den COX-2^{-/-}-Mäusen verglichen werden.

3.3.1 SC-236

SC-236 wurde in einer Konzentration von 20 mg/kg·KG über 21 Tage verabreicht. An Tag P21 ergab sich ein Nierenquotient von $11,5 \pm 0,4$ versus $17,48 \pm 0,6$ bei der Referenzgruppe ($p < 0,001$, $n = 3$). Der mittlere Durchmesser der Glomeruli betrug $(28,87 \pm 0,7) \mu\text{m}$ im Vergleich zu $(41,18 \pm 1,5) \mu\text{m}$ bei den mit DMSO behandelten Mäusen ($p < 0,005$, $n = 3$). Die kortikale Dicke lag bei $(15,59 \pm 2,1) \mu\text{m}$ versus $(45,41 \pm 2,0) \mu\text{m}$ in der Referenzgruppe ($p < 0,001$, $n = 3$). Der Anteil der Glomeruli im Bereich $58 \mu\text{m}$ zur Kapsel $(40,58 \pm 1,5)\%$ und war damit signifikant höher als bei der Referenzgruppe, in der dieser Anteil bei $(13,45 \pm 1,1)\%$ lag ($p < 0,001$, $n = 3$) (vgl. Abb. 3.14 - 3.18).

Das Maximum der Durchmesser der Glomeruli lag in Gruppe der Tiere, die mit SC-236 behandelt wurden bei etwa $20 \mu\text{m}$ im Gegensatz zu etwa $35 \mu\text{m}$ bei der Referenzgruppe (vgl. Abb. 3.19). Ab dem Maximum der Kurve der Prüfgruppe fällt ein deutlich flacherer Verlauf auf.

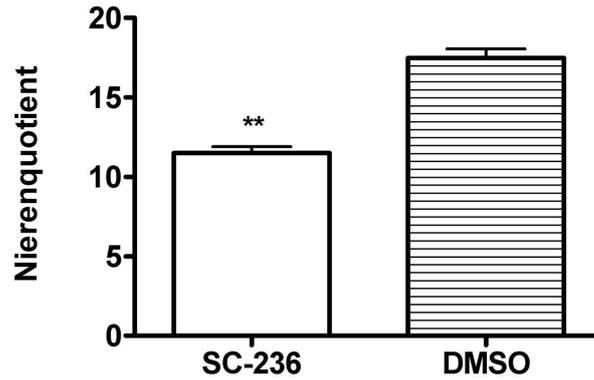


Abbildung 3.14: Nierenquotienten an Tag P21 von C57/BL6-Mäusen, behandelt mit 20 mg/kg·KG SC-236 und behandelt mit gleichen Volumina DMSO über 21 Tage. Es zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen beiden Gruppen. Dargestellt ist der Nierenquotient \pm SEM. (** $p < 0,01$, $n = 3$)

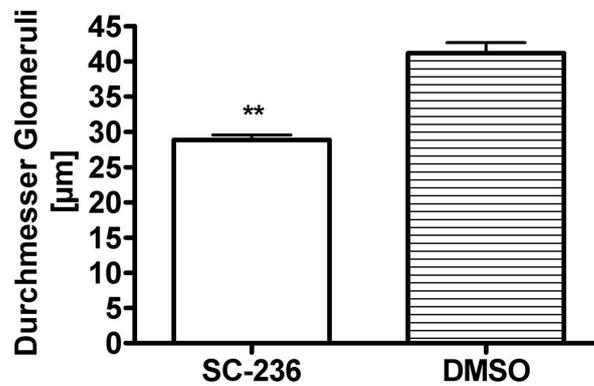


Abbildung 3.15: Die mittleren Durchmesser der Glomeruli von Nieren aus C57/BL6-Mäusen, behandelt mit 20 mg/kg·KG SC-236 und behandelt mit gleichen Volumina DMSO über 21 Tage am postpartalen Tag P21. Es zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen beiden Gruppen. Dargestellt sind die Durchmesser \pm SEM. (** $p < 0,01$, $n = 3$)

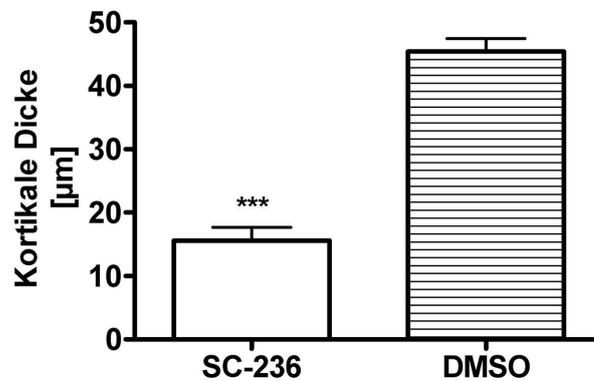


Abbildung 3.16: Die kortikale Dicke von Nieren aus C57/BL6-Mäusen, behandelt mit 20 mg/kg·KG SC-236 und behandelt mit gleichen Volumina DMSO über 21 Tage an Tag P21. Es zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen beiden Gruppen. Dargestellt sind die kortikalen Dicken \pm SEM. (***) $p < 0,001$, $n = 3$)

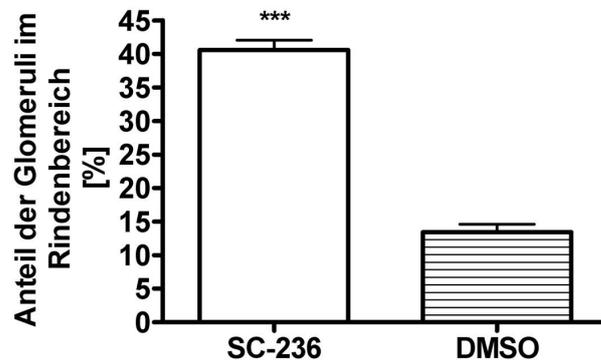


Abbildung 3.17: Darstellung der Anteile der Glomeruli im Rindbereich innerhalb $58 \mu\text{m}$ von C57/BL6-Mäusen, behandelt mit $20 \text{ mg/kg}\cdot\text{KG}$ SC-236 und behandelt mit gleichen Volumina DMSO über 21 Tage an Tag P21. Es zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen beiden Gruppen. Dargestellt ist der prozentuale Anteil der Glomeruli im Rindbereich von $58 \mu\text{m} \pm \text{SEM}$. (***) $p < 0,001$, $n = 3$)

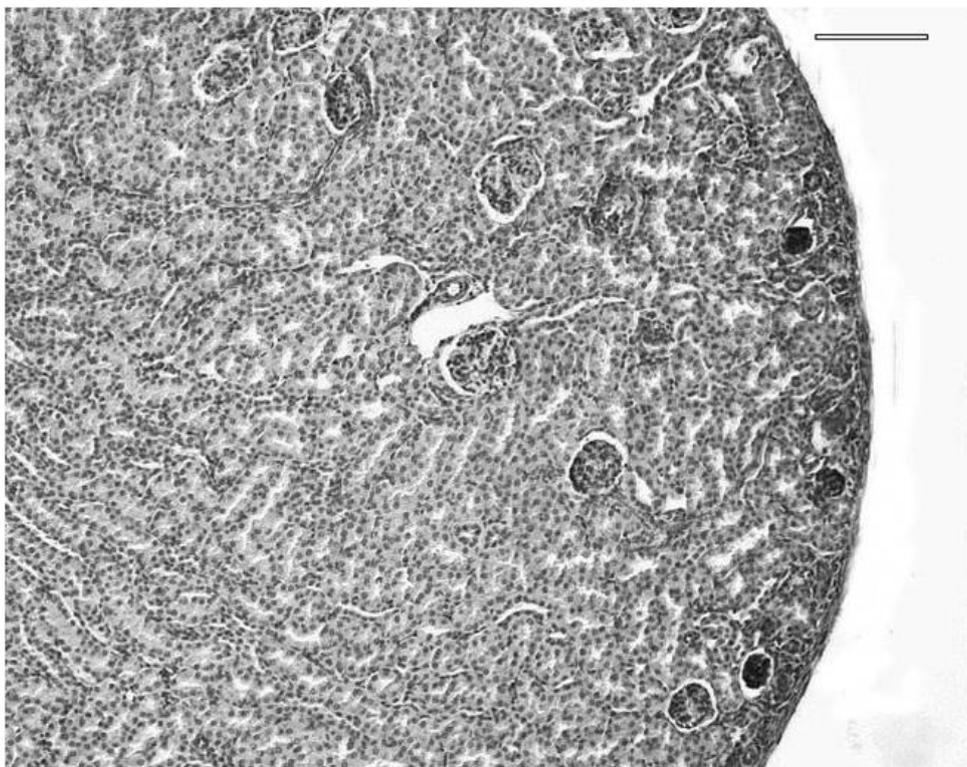


Abbildung 3.18: Ausschnitt der Niere einer C57/BL6-Maus, behandelt mit $20 \text{ mg/kg}\cdot\text{KG}$ SC-236 über 21 Tage an Tag P21, Balken entspr. $100 \mu\text{m}$, $200 \times$ vergrößert, HE-Färbung. Zu sehen sind kleine Glomeruli im subkapsulären Bereich, sowie hyperplastische Glomeruli im inneren Kortex.

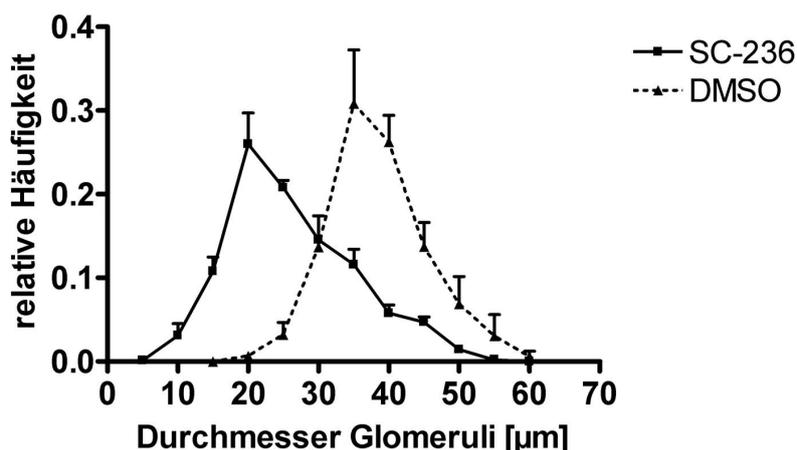


Abbildung 3.19: Verteilungskurve der relativen Häufigkeiten der Glomeruli \pm SEM von C57/BL6 Mäusen, behandelt mit 20 mg/kg-KG SC-236 und behandelt mit gleichen Volumina DMSO über 21 Tage.

3.3.2 SC-791

SC-791 ist ebenfalls ein experimenteller COX-2 Inhibitor und wurde in gleicher Konzentration wie SC-236 über 21 Tage eingesetzt. Die mit SC-791 behandelten Mäuse zeigten in allen erhobenen Parametern signifikante Veränderungen gegenüber der Referenzgruppe. Die Tiere wurden am Tag P21 getötet und präpariert.

Der Nierenquotient, berechnet aus Nierengewicht/Körpergewicht \times 1000 lag an Tag P21 bei mit SC-791 behandelten Mäusen im Mittel bei $14,24 \pm 0,1$ versus $17,48 \pm 0,6$ bei der Referenzgruppe ($p < 0,01$, $n = 3$). Der mittlere Durchmesser der Glomeruli lag bei den behandelten Mäusen bei $(30,61 \pm 1,3) \mu\text{m}$ im Gegensatz zu $(41,18 \pm 1,5) \mu\text{m}$ bei den mit DMSO behandelten Mäusen ($p < 0,01$, $n = 3$). Auch die kortikale Dicke war mit $(27,3 \pm 2,3) \mu\text{m}$ dünner als die der Referenzgruppe mit $(45,41 \pm 2,0) \mu\text{m}$ ($p < 0,01$, $n = 3$). Der Anteil der Glomeruli im Bereich von $58 \mu\text{m}$ gemessen senkrecht zur Kapsel lag bei $(26,64 \pm 3,5)\%$ im Gegensatz zur Referenzgruppe bei $(13,45 \pm 1,1)\%$ ($p < 0,05$, $n = 3$) (vgl. Abb. 3.20 - 3.24).

Die erhobenen Daten wurden ebenfalls in einen Graphen mit den Durchmessern auf dem x-Achsenabschnitt und die relative Häufigkeit auf dem y-Achsenabschnitt aufgetragen. Das Maximum des Graphen war bei den mit SC-791 behandelten Mäusen etwa $10 \mu\text{m}$ nach links verschoben und liegt bei etwa $25 \mu\text{m}$ versus etwa $35 \mu\text{m}$ bei der Referenzgruppe (vgl. Abb. 3.25). Vor allem im Bereich von 40 bis $60 \mu\text{m}$ fällt ein flacherer Kurvenverlauf auf.

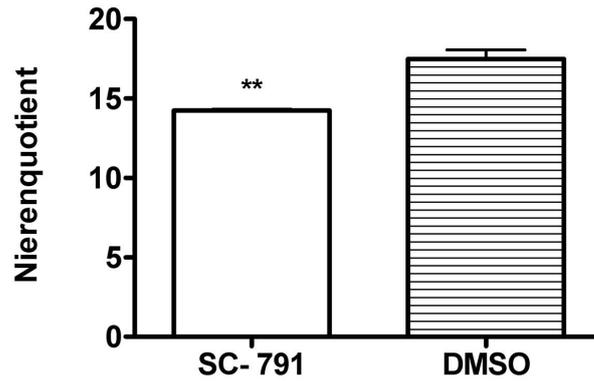


Abbildung 3.20: Nierenquotienten an Tag P21 von C57/BL6-Mäusen, behandelt mit 20 mg/kg·KG SC-791 und behandelt mit gleichen Volumina DMSO über 21 Tage am postpartalen Tag P21. Es zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen beiden Gruppen. Dargestellt ist der Nierenquotient \pm SEM. (**p < 0,01, n = 3)

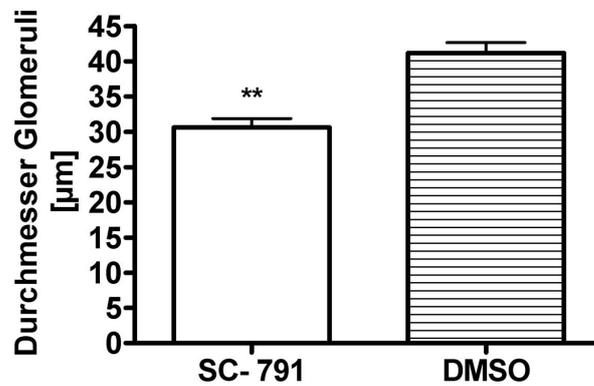


Abbildung 3.21: Die mittleren Durchmesser der Glomeruli von Nieren aus C57/BL6-Mäusen, behandelt mit 20 mg/kg·KG SC-791 und behandelt mit gleichen Volumina DMSO über 21 Tage am postpartalen Tag P21. Es zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen beiden Gruppen. Dargestellt sind die Durchmesser \pm SEM. (**p < 0,01, n = 3)

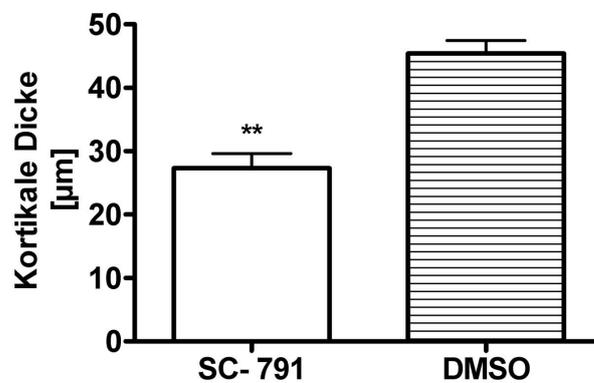


Abbildung 3.22: Die kortikale Dicke von Nieren aus C57/BL6-Mäusen, behandelt mit 20 mg/kg·KG SC-791 und behandelt mit gleichen Volumina DMSO über 21 Tage an Tag P21. Es zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen beiden Gruppen. Dargestellt sind die kortikalen Dicken \pm SEM. (**p < 0,01, n = 3)

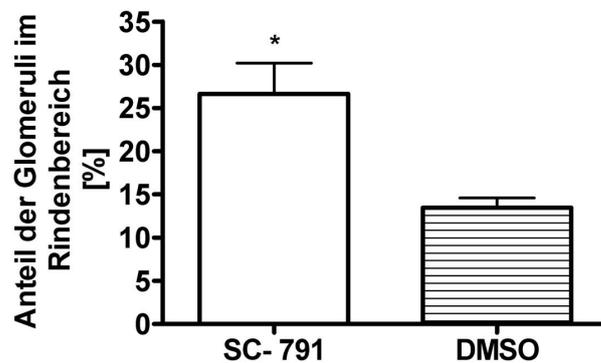


Abbildung 3.23: Darstellung der Anteile der Glomeruli im Rindbereich innerhalb $58 \mu\text{m}$ von C57/BL6-Mäusen, behandelt mit $20 \text{ mg/kg}\cdot\text{KG}$ SC-791 und behandelt mit gleichen Volumina DMSO über 21 Tage an Tag P21. Es zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen beiden Gruppen. Dargestellt ist der prozentuale Anteil der Glomeruli im Rindbereich von $58 \mu\text{m} \pm \text{SEM}$. (* $p < 0,05$, $n = 3$)

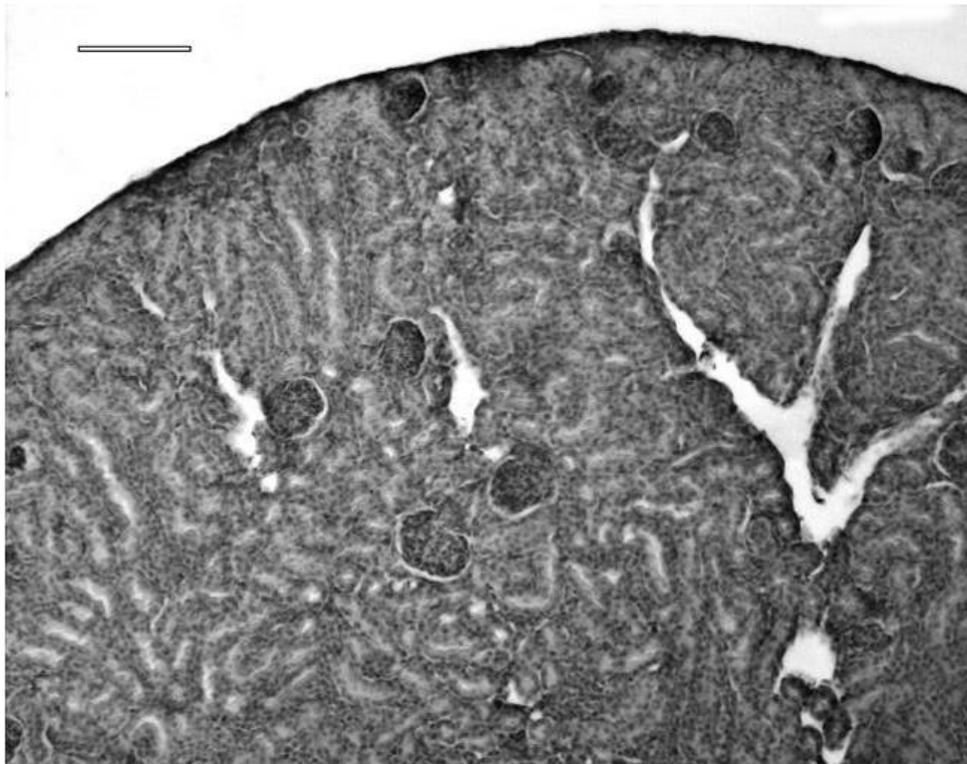


Abbildung 3.24: Ausschnitt der Niere einer C57/BL6-Maus, behandelt mit $20 \text{ mg/kg}\cdot\text{KG}$ SC-791 über 21 Tage an Tag P21, Balken entspr. $100 \mu\text{m}$, $200 \times$ vergrößert, HE-Färbung. Zu sehen sind kleine Glomeruli im subkapsulären Bereich und hyperplastische Glomeruli im inneren Kortex und Markbereich.

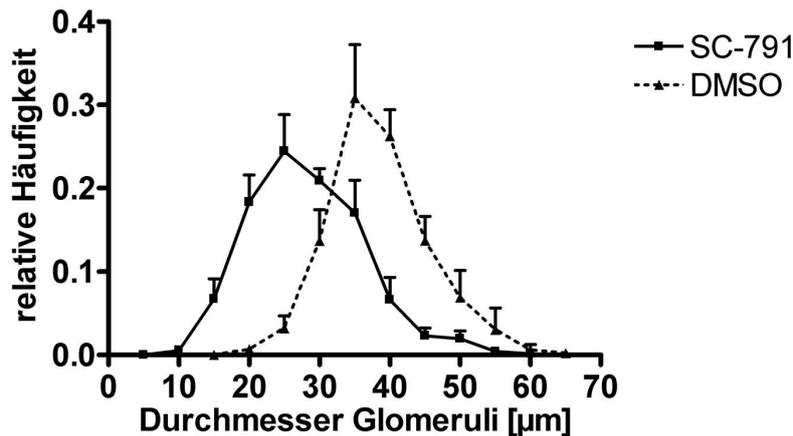


Abbildung 3.25: Verteilungskurve der relativen Häufigkeiten der Glomeruli \pm SEM von C57/BL6 Mäusen, behandelt mit 20 mg/kg-KG SC-791 und behandelt mit gleichen Volumina DMSO über 21 Tage.

3.3.3 Celecoxib

Celecoxib wurde in einer Konzentration von 100 mg/kg-KG eingesetzt. Der Nierenquotient, berechnet aus Nierengewicht/Körpergewicht \times 1000 lag an Tag P21 bei $16,27 \pm 0,5$ und war damit nicht signifikant verändert gegenüber der Referenzgruppe, bei der der Nierenquotient bei $17,48 \pm 0,6$ lag ($p = 0,1915$, $n = 3$).

Der mittlere Durchmesser der Glomeruli zeigte einen signifikanten Unterschied zur Referenzgruppe und lag bei $(33,85 \pm 0,9) \mu\text{m}$ versus $(41,18 \pm 1,5) \mu\text{m}$ ($p < 0,05$, $n = 3$). Die kortikale Dicke und der Anteil der Glomeruli im Bereich von $58 \mu\text{m}$ zeigten wiederum keine signifikanten Unterschiede zur Referenzgruppe. Die mittlere kortikale Dicke lag bei $(40,65 \pm 1,7) \mu\text{m}$ versus $(45,41 \pm 2,0) \mu\text{m}$ ($p = 0,1802$, $n = 3$), der Anteil der Glomeruli im Bereich von $58 \mu\text{m}$ lag bei $(13,19 \pm 0,9)\%$ versus $(13,45 \pm 1,1)\%$ ($p = 0,871$, $n = 3$) (vgl. Abb. 3.26 - 3.30).

Das Maximum der Verteilungskurve der Durchmesser der Glomeruli lag bei den mit Celecoxib behandelten Tieren bei etwa $30 \mu\text{m}$, im Gegensatz zu $35 \mu\text{m}$ in der Referenzgruppe. Beide Kurvenverläufe sind bis etwa $45 \mu\text{m}$ parallel, ab $45 \mu\text{m}$ ist der Verlauf in der Celecoxib-Gruppe minimal flacher (vgl. Abb. 3.31).

3.3.4 Etoricoxib

Etoricoxib wurde in einer Konzentration von 35 mg/kg-KG verabreicht. Der Nierenquotient lag bei den mit Etoricoxib behandelten Tieren bei $14,17 \pm 0,4$ versus $17,48 \pm 0,6$ bei den mit DMSO behandelten Mäusen ($p < 0,01$, $n = 3$). Der mittlere Durchmesser der Glomeruli lag in der Prüfgruppe bei $(29,88 \pm 0,6) \mu\text{m}$ und war damit signifikant niedriger als in der Referenzgruppe, deren mittlerer Durchmesser

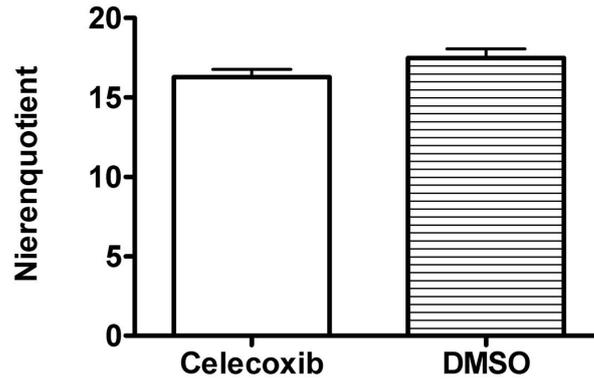


Abbildung 3.26: Nierenquotienten an Tag P21 von C57/BL6-Mäusen, behandelt mit 100 mg/kg·KG Celecoxib und behandelt mit gleichen Volumina DMSO über 21 Tage an Tag P21. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen beiden Gruppen. Dargestellt ist der Nierenquotient \pm SEM. ($p > 0,05$, $n = 3$)

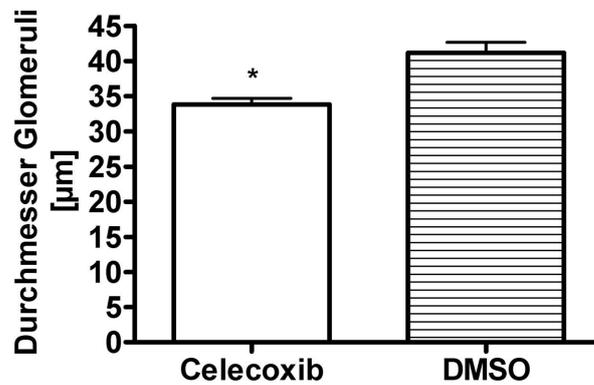


Abbildung 3.27: Die mittleren Durchmesser der Glomeruli von Nieren aus C57/BL6-Mäusen, behandelt mit 100 mg/kg·KG Celecoxib und behandelt mit gleichen Volumina DMSO über 21 Tage am postpartalen Tag P21. Es zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen beiden Gruppen. Dargestellt sind die Durchmesser \pm SEM. (* $p < 0,05$, $n = 3$)

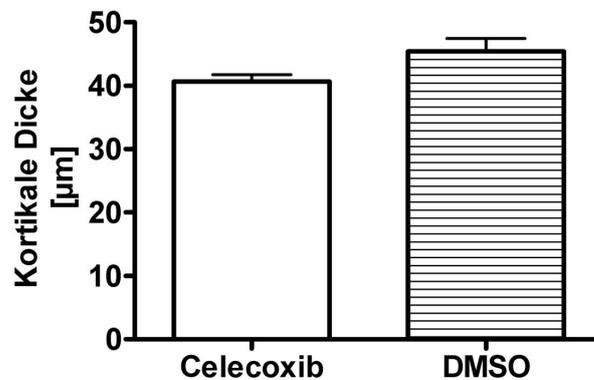


Abbildung 3.28: Die kortikale Dicke von Nieren aus C57/BL6-Mäusen, behandelt mit 100 mg/kg·KG Celecoxib und behandelt mit gleichen Volumina DMSO über 21 Tage. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen beiden Gruppen. Dargestellt sind die kortikalen Dicken \pm SEM. ($p > 0,05$, $n = 3$)

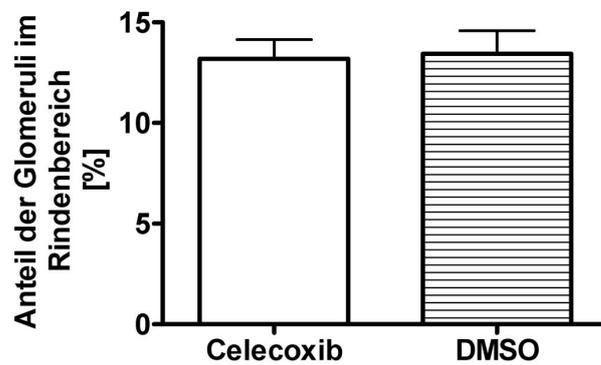


Abbildung 3.29: Darstellung der Anteile der Glomeruli im Rindbereich innerhalb $58 \mu\text{m}$ von C57/BL6-Mäusen, behandelt mit $100 \text{ mg/kg}\cdot\text{KG}$ Celecoxib und behandelt mit gleichen Volumina DMSO über 21 Tage an Tag P21. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen beiden Gruppen. Dargestellt ist der prozentuale Anteil der Glomeruli im Rindbereich von $58 \mu\text{m} \pm \text{SEM}$. ($p > 0,05$, $n = 3$)

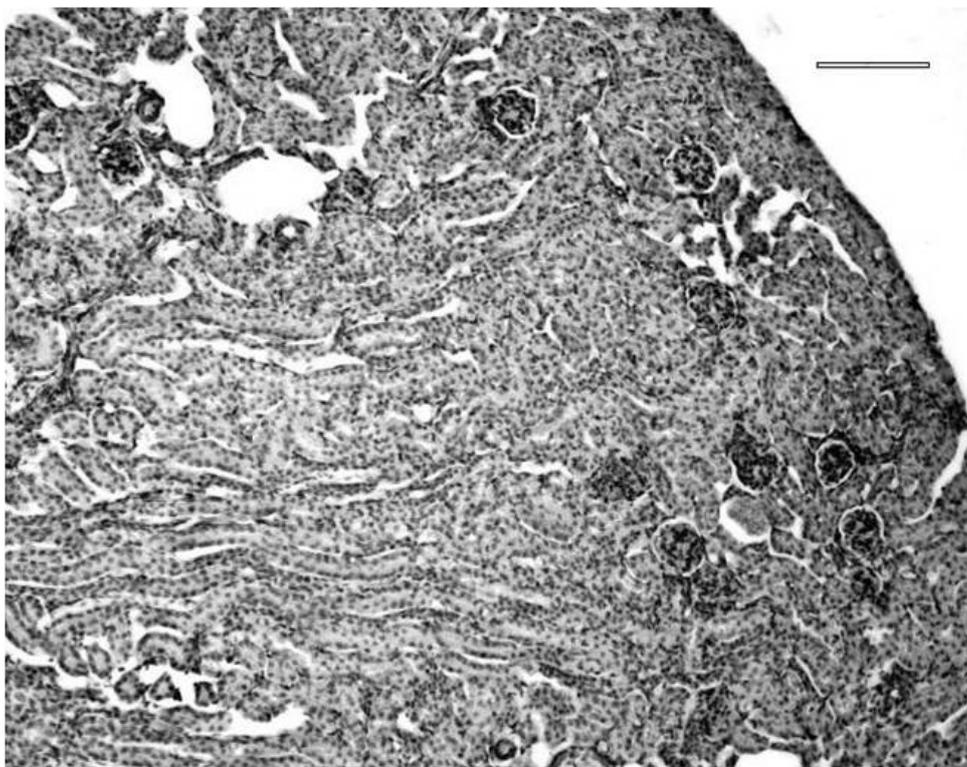


Abbildung 3.30: Ausschnitt der Niere einer C57/BL6-Maus, behandelt mit $100 \text{ mg/kg}\cdot\text{KG}$ Celecoxib 21 Tage an Tag P21, Balken entspr. $100 \mu\text{m}$, $200 \times$ vergrößert, HE-Färbung. Zu sehen sind kleine Glomeruli verglichen mit Abb. 3.6

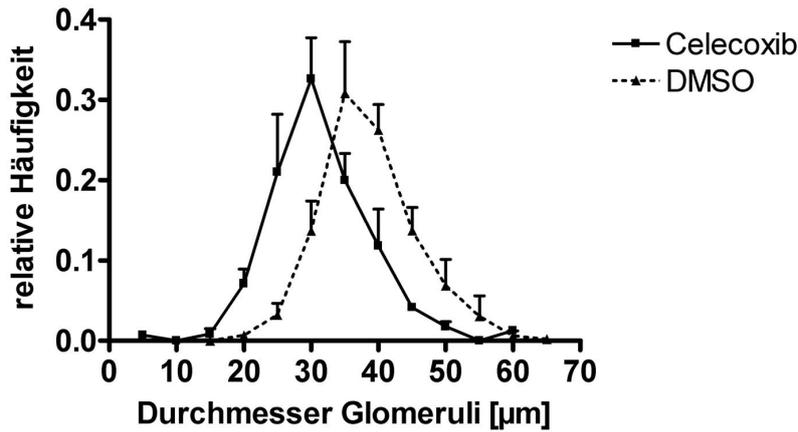


Abbildung 3.31: Verteilungskurve der relativen Häufigkeiten der Glomeruli \pm SEM von C57/BL6-Mäusen, behandelt mit 100 mg/kg·KG Celecoxib und behandelt mit gleichen Volumina DMSO über 21 Tage an Tag P21.

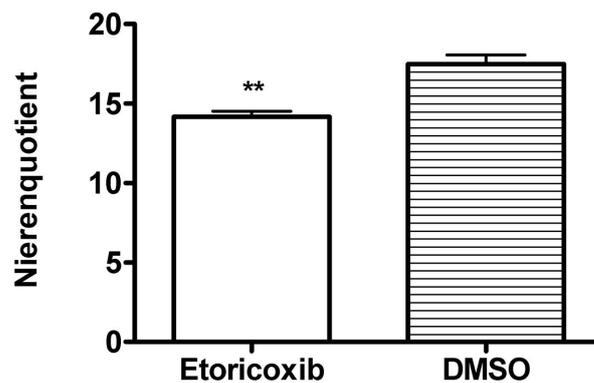


Abbildung 3.32: Nierenquotienten an Tag P21 von C57/BL6-Mäusen, behandelt mit 35 mg/kg·KG Etoricoxib und behandelt mit gleichen Volumina DMSO über 21 Tage. Es zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen beiden Gruppen. Dargestellt ist der Nierenquotient \pm SEM. (** $P < 0,01$, $n = 3$)

der Glomeruli bei $(41,18 \pm 1,5) \mu\text{m}$ ($p < 0,01$, $n = 3$) lag. Auch die kortikale Dicke zeigte einen signifikanten Unterschied zur Referenzgruppe, bei den mit Etoricoxib behandelten Mäusen lag sie bei $(29,6 \pm 2,2) \mu\text{m}$ versus $(45,41 \pm 2,0) \mu\text{m}$ in der Referenzgruppe ($p < 0,01$, $n = 3$). Der Anteil der Glomeruli im Rindbereich bis $58 \mu\text{m}$ lag deutlich über der Referenzgruppe mit einem Anteil von $(23,45 \pm 1,4)\%$ im Gegensatz zu $(13,45 \pm 1,1)\%$ in der Referenzgruppe ($p < 0,01$, $n = 3$) (vgl. Abb. 3.32 - 3.36).

Bei der Verteilungskurve der Glomeruli fand sich das Maximum bei etwa $25 \mu\text{m}$ versus etwa $35 \mu\text{m}$ in der Referenzgruppe. Zwischen 40 und $60 \mu\text{m}$ war der Verlauf der Kurve etwas flacher, als in der Referenzgruppe (vgl. Abb. 3.37).

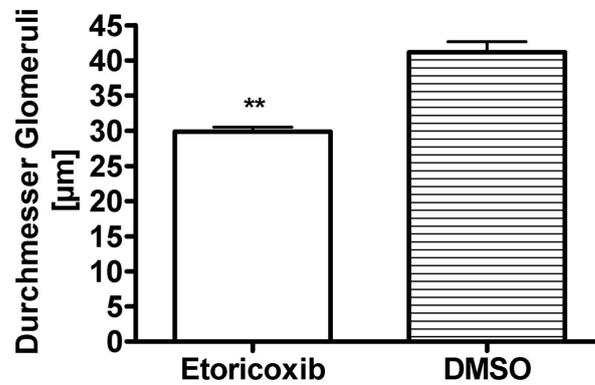


Abbildung 3.33: Die mittleren Durchmesser der Glomeruli von Nieren aus C57/BL6-Mäusen, behandelt mit 35 mg/kg·KG Etoricoxib und behandelt mit gleichen Volumina DMSO über 21 Tage am postpartalen Tag P21. Es zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen beiden Gruppen. Dargestellt sind die Durchmesser \pm SEM. (** $p < 0,01$, $n = 3$)

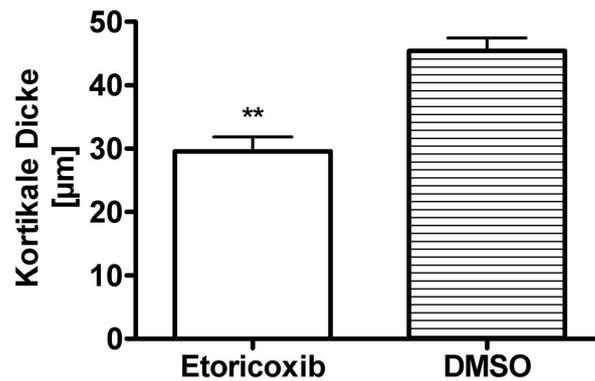


Abbildung 3.34: Die kortikale Dicke von Nieren aus C57/BL6-Mäusen, behandelt mit 35 mg/kg·KG Etoricoxib und behandelt mit gleichen Volumina DMSO über 21 Tage an Tag P21. Es zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen beiden Gruppen. Dargestellt sind die kortikalen Dicken \pm SEM. (** $p < 0,01$, $n = 3$)

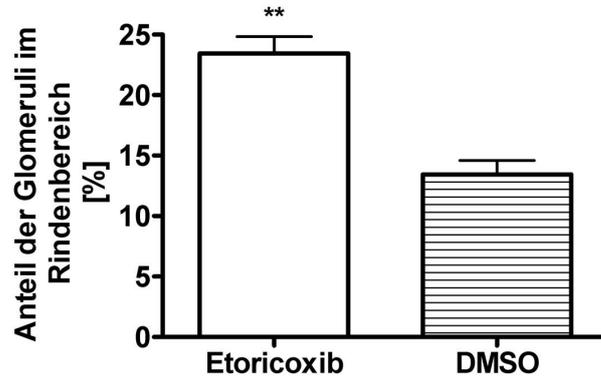


Abbildung 3.35: Darstellung der Anteile der Glomeruli im Rindbereich innerhalb $58 \mu\text{m}$ von C57/BL6-Mäusen, behandelt mit $35 \text{ mg/kg}\cdot\text{KG}$ Etoricoxib und behandelt mit gleichen Volumina DMSO über 21 Tage an Tag P21. Es zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen beiden Gruppen. Dargestellt ist der prozentuale Anteil der Glomeruli im Rindbereich von $58 \mu\text{m} \pm \text{SEM}$. (** $p < 0,01$, $n = 3$)

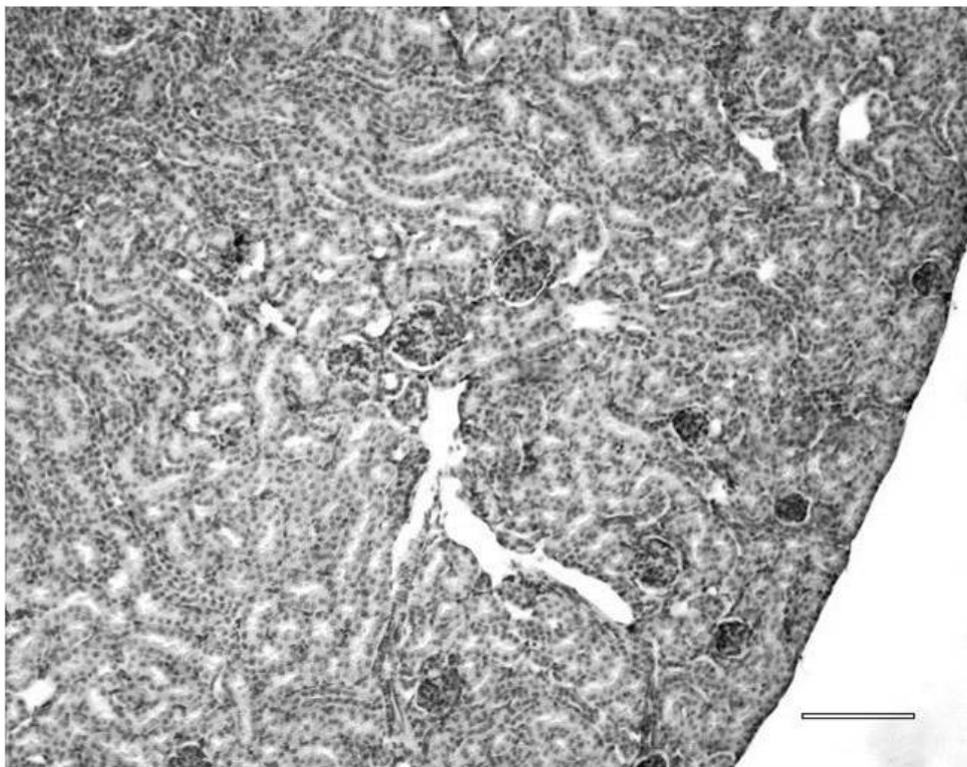


Abbildung 3.36: Ausschnitt der Niere einer C57/BL6-Maus, behandelt mit $35 \text{ mg/kg}\cdot\text{KG}$ Etoricoxib über 21 Tage an Tag P21, Balken entspr. $100 \mu\text{m}$, $200 \times$ vergrößert, HE-Färbung. Zu sehen sind zu kleine Glomeruli im subkapsulären Bereich, sowie hyperplastische im inneren Kortex und Markbereich.

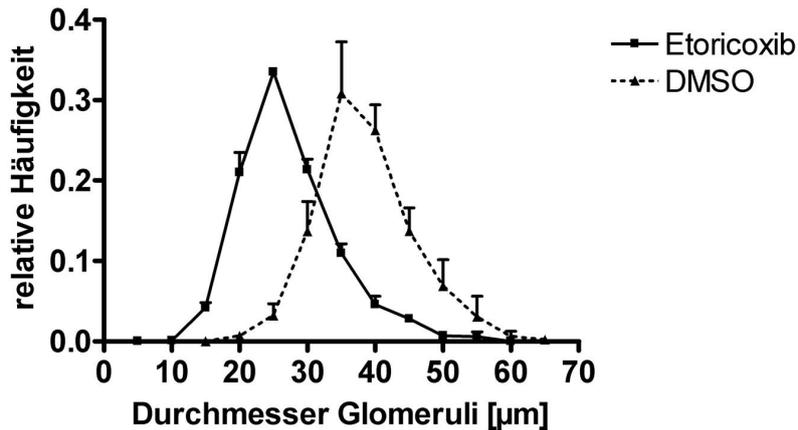


Abbildung 3.37: Verteilungskurve der relativen Häufigkeiten der Glomeruli \pm SEM von C57/BL6-Mäusen, behandelt mit 35 mg/kg-KG Etoricoxib und behandelt mit gleichen Volumina DMSO über 21 Tage.

3.3.5 Lumiracoxib

Lumiracoxib wurde über 21 Tage in einer Konzentration von 50 mg/kg-KG verabreicht. Es zeigten sich im Vergleich zur Referenzgruppe signifikante Werte. Der Nierenquotient lag bei $14,44 \pm 0,1$ im Vergleich zu $17,48 \pm 0,6$ bei den mit DMSO behandelten Mäusen ($p < 0,001$, $n = 5$). Der mittlere Durchmesser der Glomeruli betrug $(31,35 \pm 1,7) \mu\text{m}$ versus $(41,18 \pm 1,5) \mu\text{m}$ in der Referenzgruppe ($p < 0,05$, $n = 3$). Die kortikale Dicke betrug bei den mit Lumiracoxib behandelten Tieren $(34,51 \pm 1) \mu\text{m}$ und war damit dünner als die der Referenzgruppe, die bei $(45,41 \pm 2,0) \mu\text{m}$ lag ($p < 0,01$, $n = 3$). Der Anteil der Glomeruli im Rindenbereich von $58 \mu\text{m}$ war $(21,86 \pm 1,8)\%$ versus $(13,45 \pm 1,1)\%$ in der Referenzgruppe ($p < 0,05$, $n = 3$) (vgl. Abb. 3.38 - 3.42).

In der Verteilungskurve fand sich das Maximum in der Prüfgruppe bei etwa $25 \mu\text{m}$ im Vergleich zu $35 \mu\text{m}$ bei der Referenzgruppe. Die Kurve der Prüfgruppe verlief um etwa $10 \mu\text{m}$ nach links verschoben (vgl. Abb. 3.43).

3.3.6 Rofecoxib

Rofecoxib wurde in einer Konzentration von 10 mg/kg-KG über 21 Tage eingesetzt. Der Nierenquotient, aus Nierengewicht/Körpergewicht $\times 1000$ berechnet, lag bei den mit Rofecoxib behandelten Tieren bei $13,87 \pm 0,1$ versus $17,48 \pm 0,6$ bei den mit DMSO behandelten Mäusen ($p < 0,01$, $n = 3$).

Der mittlere Durchmesser der Glomeruli lag in dieser Gruppe bei $(29,56 \pm 1,3) \mu\text{m}$ und war damit signifikant niedriger als in der Referenzgruppe, deren mittlerer Durchmesser der Glomeruli bei $(41,18 \pm 1,5) \mu\text{m}$ ($p < 0,01$, $n = 3$) lag. Auch die kortikale Dicke zeigte einen signifikanten Unterschied zur Referenzgruppe, bei den mit Rofecoxib behandelten Mäusen lag sie bei $(31,95 \pm 3) \mu\text{m}$ versus $(45,41 \pm$

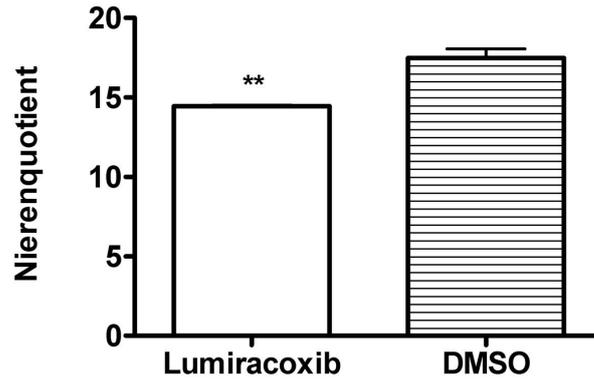


Abbildung 3.38: Nierenquotienten an Tag P21 von C57/BL6-Mäusen, behandelt mit 50 mg/kg·KG Lumiracoxib und behandelt mit gleichen Volumina DMSO über 21 Tage. Es zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen beiden Gruppen. Dargestellt ist der Nierenquotient \pm SEM. (**p < 0,01, n = 5)

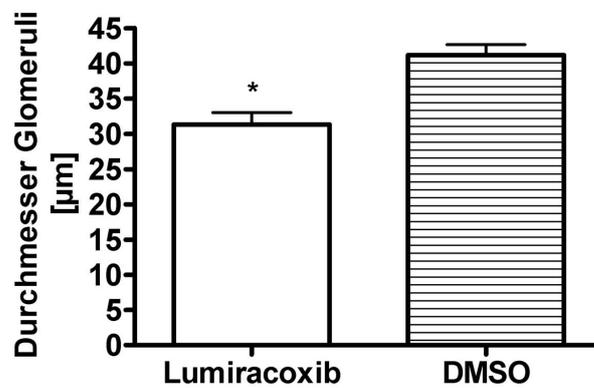


Abbildung 3.39: Die mittleren Durchmesser der Glomeruli von Nieren aus C57/BL6-Mäusen, behandelt mit 50 mg/kg·KG Lumiracoxib und behandelt mit gleichen Volumina DMSO über 21 Tage an Tag P21. Es zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen beiden Gruppen. Dargestellt sind die Durchmesser \pm SEM. (*p < 0,05, n = 3)

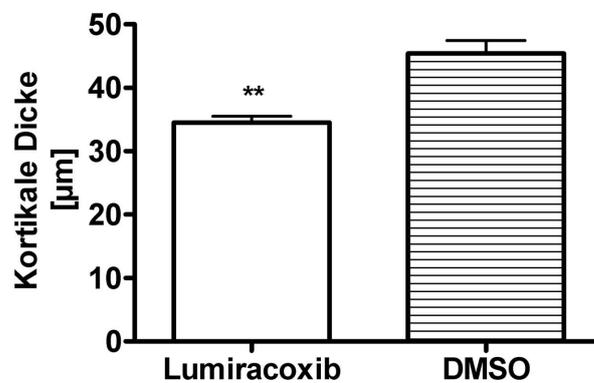


Abbildung 3.40: Die kortikale Dicke von Nieren aus C57/BL6-Mäusen, behandelt mit 50 mg/kg·KG Lumiracoxib und behandelt mit gleichen Volumina DMSO über 21 Tage am postpartalen Tag P21 entnommen. Es zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen beiden Gruppen. Dargestellt sind die kortikalen Dicken \pm SEM. (**p < 0,01, n = 3)

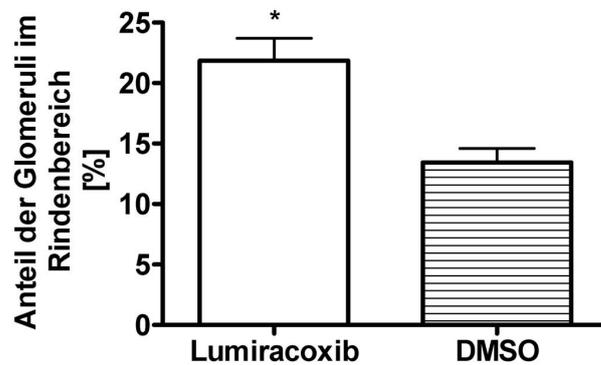


Abbildung 3.41: Darstellung der Anteile der Glomeruli im Rindenbereich innerhalb $58 \mu\text{m}$ an Tag P21 von C57/BL6-Mäusen, behandelt mit $50 \text{ mg/kg}\cdot\text{KG}$ Lumiracoxib und behandelt mit gleichen Volumina DMSO über 21 Tage. Es zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen beiden Gruppen. Dargestellt ist der prozentuale Anteil der Glomeruli im Rindenbereich von $58 \mu\text{m} \pm \text{SEM}$. (* $p < 0,05$, $n = 3$)

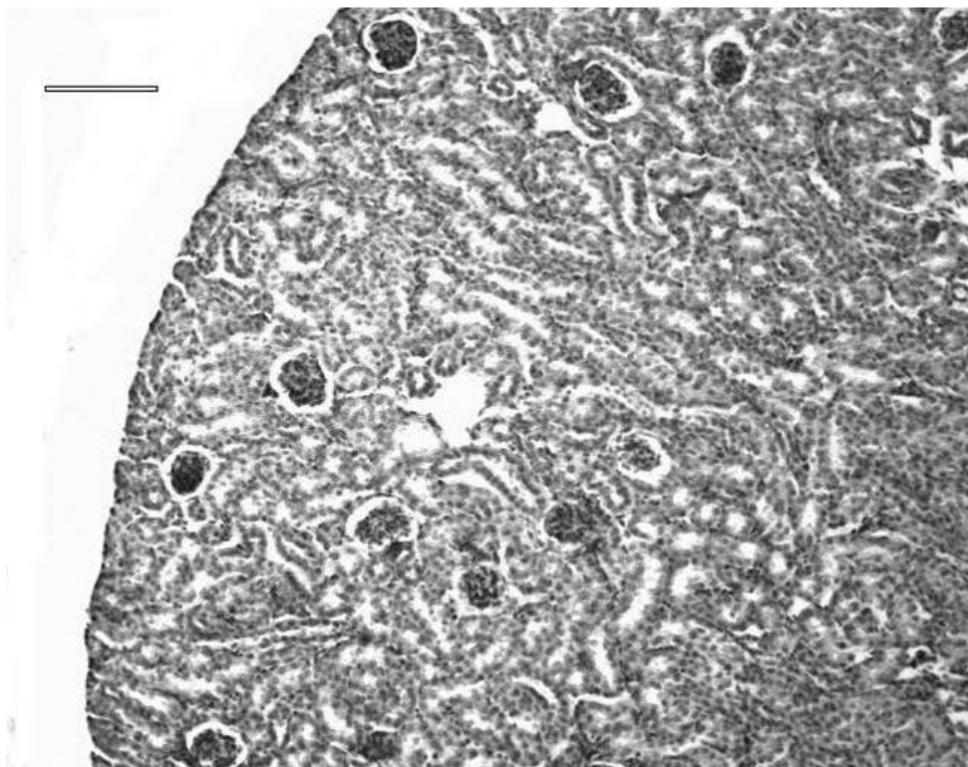


Abbildung 3.42: Ausschnitt der Niere einer C57/BL6-Maus, behandelt mit $50 \text{ mg/kg}\cdot\text{KG}$ Lumiracoxib über 21 Tage an Tag P21, Balken entspr. $100 \mu\text{m}$, $200\times$ vergrößert, HE-Färbung. Im Vergleich zu Abb. 3.6 sieht man zu kleine Glomeruli, die teilweise im subkapsulären Bereich liegen.

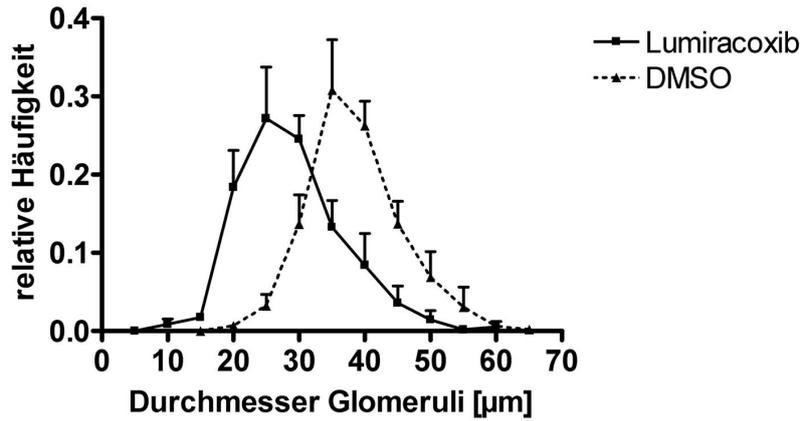


Abbildung 3.43: Verteilungskurve der relativen Häufigkeiten der Glomeruli \pm SEM von C57/BL6-Mäusen, behandelt mit 50 mg/kg·KG Lumiracoxib und behandelt mit gleichen Volumina DMSO über 21 Tage an Tag P21.

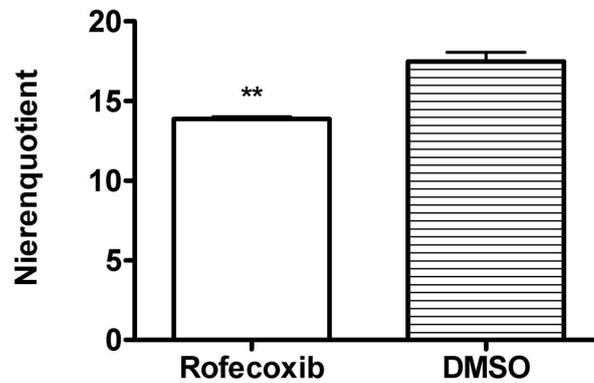


Abbildung 3.44: Nierenquotienten an Tag P21 von C57/BL6-Mäusen, behandelt mit 10 mg/kg·KG Rofecoxib und behandelt mit gleichen Volumina DMSO über 21 Tage. Es zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen beiden Gruppen. Dargestellt ist der Nierenquotient \pm SEM. (** $p < 0,01$, $n = 3$)

2,0) μm in der Referenzgruppe ($p < 0,05$, $n = 3$). Der Anteil der Glomeruli im Rindbereich bis 58 μm lag signifikant über der Referenzgruppe mit einem Anteil von $(17,86 \pm 0,8)\%$ im Gegensatz zu $(13,45 \pm 1,1)\%$ in der Referenzgruppe ($p < 0,05$, $n = 3$) (vgl. Abb. 3.44 - 3.48).

Bei der Verteilungskurve der Glomeruli (vgl. Abb. 3.49) fand sich das Maximum bei etwa 25 μm versus etwa 35 μm in der Referenzgruppe. Ansonsten zeigte sich bei beiden Gruppen ein ähnlicher Kurvenverlauf.

3.3.7 Valdecoxib

Valdecoxib wurde in einer Konzentration von 10 mg/kg·KG über 21 Tage verabreicht. Der Nierenquotient zeigt keinen signifikanten Unterschied zur Referenzgruppe. Er lag bei $16,29 \pm 0,3$ versus $17,48 \pm 0,6$ bei der Referenzgruppe ($p = 0,1384$, $n = 3$).

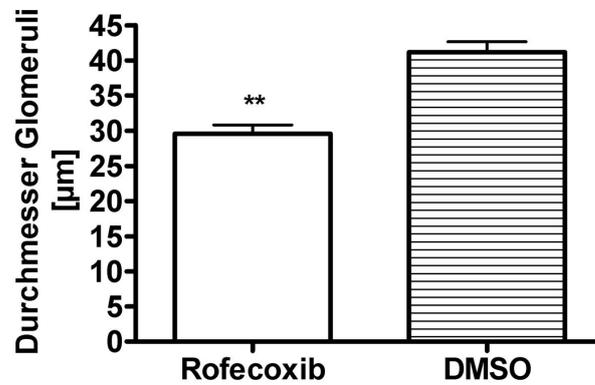


Abbildung 3.45: Die mittleren Durchmesser der Glomeruli von Nieren aus C57/BL6-Mäusen, behandelt mit 10 mg/kg·KG Rofecoxib und behandelt mit gleichen Volumina DMSO über 21 Tage am postpartalen Tag P21 entnommen. Es zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen beiden Gruppen. Dargestellt sind die Durchmesser \pm SEM. (** $p < 0,01$, $n = 3$)

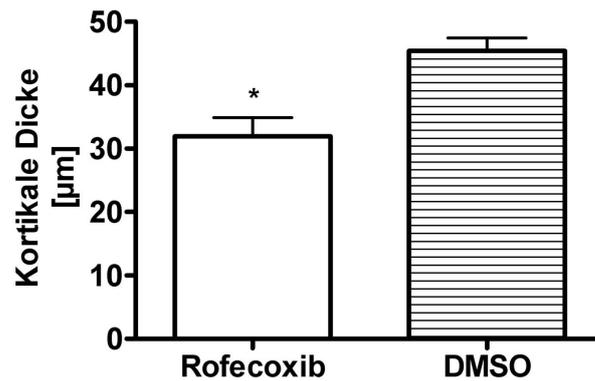


Abbildung 3.46: Die kortikale Dicke an Tag P21 von Nieren aus C57/BL6-Mäusen, behandelt mit 10 mg/kg·KG Rofecoxib und behandelt mit gleichen Volumina DMSO über 21 Tage an. Es zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen beiden Gruppen. Dargestellt sind die kortikalen Dicken \pm SEM. (* $p < 0,05$, $n = 3$)

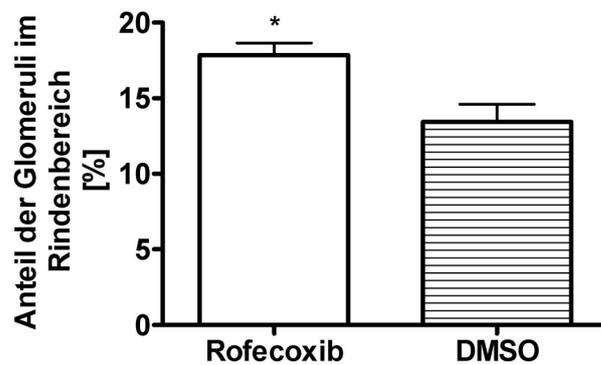


Abbildung 3.47: Darstellung der Anteile der Glomeruli im Rindbereich innerhalb $58 \mu\text{m}$ an Tag P21 von C57/BL6-Mäusen, behandelt mit $10 \text{ mg/kg}\cdot\text{KG}$ Rofecoxib und behandelt mit gleichen Volumina DMSO über 21 Tage. Es zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen beiden Gruppen. Dargestellt ist der prozentuale Anteil der Glomeruli im Rindbereich von $58 \mu\text{m} \pm \text{SEM}$. (* $p < 0,05$, $n = 3$)

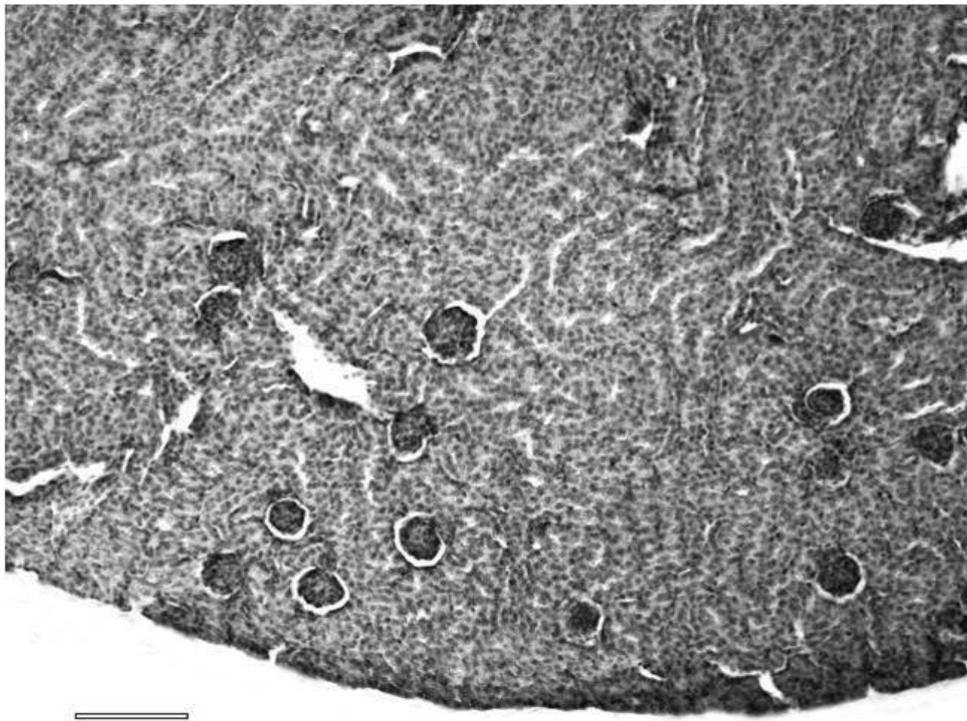


Abbildung 3.48: Ausschnitt der Niere einer C57/BL6-Maus, behandelt mit $10 \text{ mg/kg}\cdot\text{KG}$ Rofecoxib über 21 Tage an Tag P21, Balken entspr. $100 \mu\text{m}$, $200\times$ vergrößert, HE-Färbung. Zu sehen sind kleine Glomeruli, verglichen mit Abb. 3.6, die subkapsulär liegen.

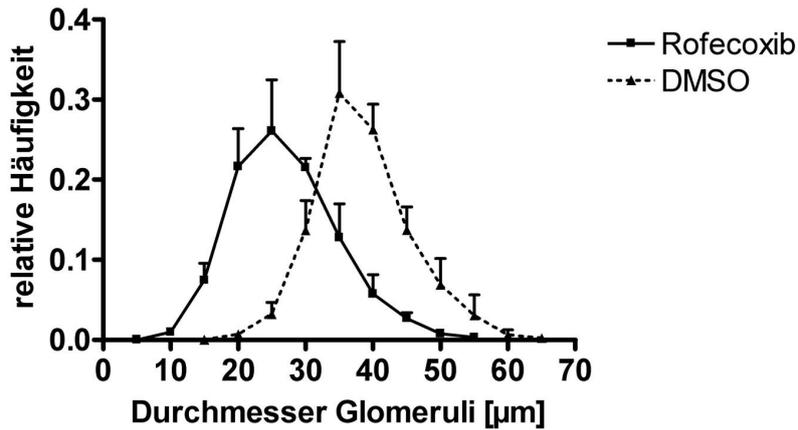


Abbildung 3.49: Verteilungskurve der relativen Häufigkeiten der Glomeruli \pm SEM von C57/BL6-Mäusen, behandelt mit 10 mg/kg·KG Rofecoxib und behandelt mit gleichen Volumina DMSO über 21 Tage an Tag P21.

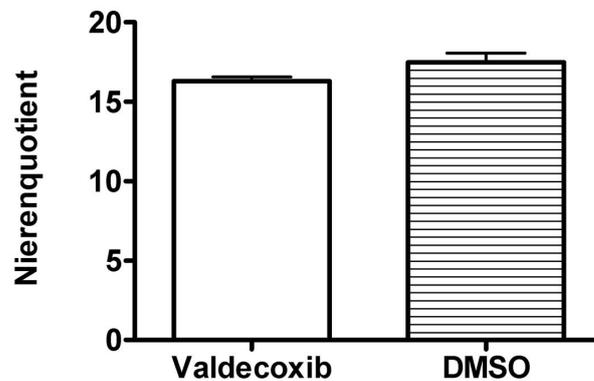


Abbildung 3.50: Nierenquotienten an Tag P21 von C57/BL6-Mäusen, behandelt mit 10 mg/kg·KG Valdecoxib und behandelt mit gleichen Volumina DMSO über 21 Tage am postpartalen Tag P21. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen beiden Gruppen. Dargestellt ist der Nierenquotient \pm SEM. ($p > 0,05$, $n = 3$)

Der Durchmesser der Glomeruli betrug $(34,08 \pm 0,8) \mu\text{m}$ bei den mit Valdecoxib behandelten Mäusen und war somit signifikant niedriger als der Durchmesser der Glomeruli in der Referenzgruppe, der bei $(41,18 \pm 1,5) \mu\text{m}$ ($p < 0,05$, $n = 3$) lag. Die mittlere kortikale Dicke lag bei $(34,99 \pm 1,3) \mu\text{m}$ versus $(45,41 \pm 2,0) \mu\text{m}$ in der Referenzgruppe ($p < 0,05$, $n = 3$). Der Anteil der Glomeruli im Rindenbereich von $58 \mu\text{m}$ war $(18,37 \pm 0,87)\%$ im Vergleich zu $(13,45 \pm 1,1)\%$ in der Referenzgruppe ($p < 0,05$, $n = 3$) (vgl. Abb. 3.50 - 3.54).

In der Verteilungskurve lag das Maximum der Durchmesser der Glomeruli bei etwa $30 \mu\text{m}$ versus $35 \mu\text{m}$ in der Referenzkurve. Der Kurvenverlauf im Bereich von 45 bis $65 \mu\text{m}$ verlief etwas flacher in der Prüfgruppe (vgl. Abb. 3.55).

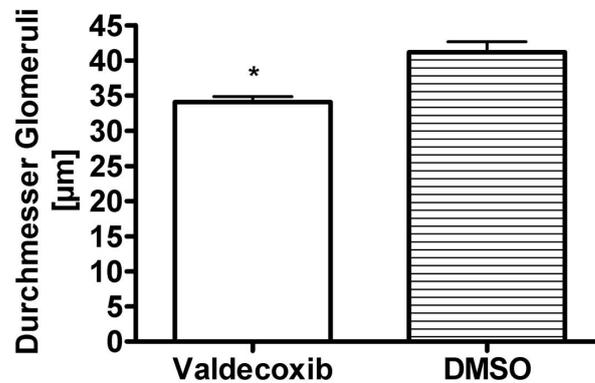


Abbildung 3.51: Die mittleren Durchmesser der Glomeruli von Nieren aus C57/BL6-Mäusen, behandelt mit 10 mg/kg·KG Valdecoxib und behandelt mit gleichen Volumina DMSO über 21 Tage an Tag P21 entnommen. Es zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen beiden Gruppen. Dargestellt sind die Durchmesser \pm SEM. (* $p < 0,05$, $n = 3$)

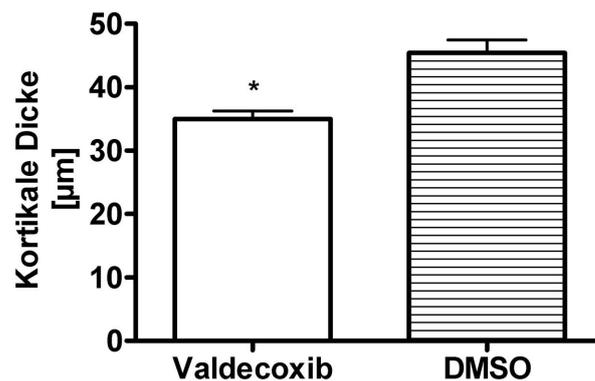


Abbildung 3.52: Die kortikale Dicke von an Tag P21 entnommen Nieren aus C57/BL6-Mäusen, behandelt mit 10 mg/kg·KG Valdecoxib und behandelt mit gleichen Volumina DMSO über 21 Tage. Es zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen beiden Gruppen. Dargestellt sind die kortikalen Dicken \pm SEM. (* $p < 0,05$, $n = 3$)

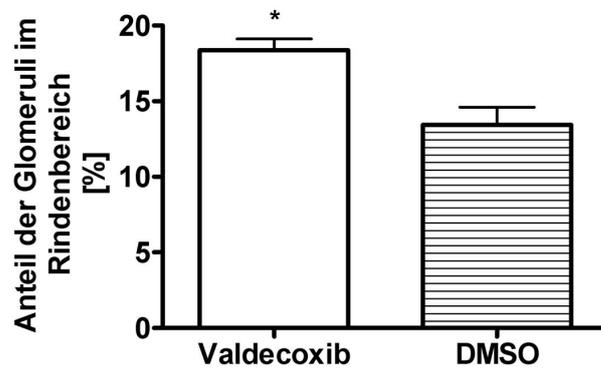


Abbildung 3.53: Darstellung der Anteile der Glomeruli im Rindbereich innerhalb $58 \mu\text{m}$ von C57/BL6-Mäusen, behandelt mit $10 \text{ mg/kg}\cdot\text{KG}$ Valdecoxib und behandelt mit gleichen Volumina DMSO über 21 Tage an Tag P21. Es zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen beiden Gruppen. Dargestellt ist der prozentuale Anteil der Glomeruli im Rindbereich von $58 \mu\text{m} \pm \text{SEM}$. (* $p < 0,05$, $n = 3$)

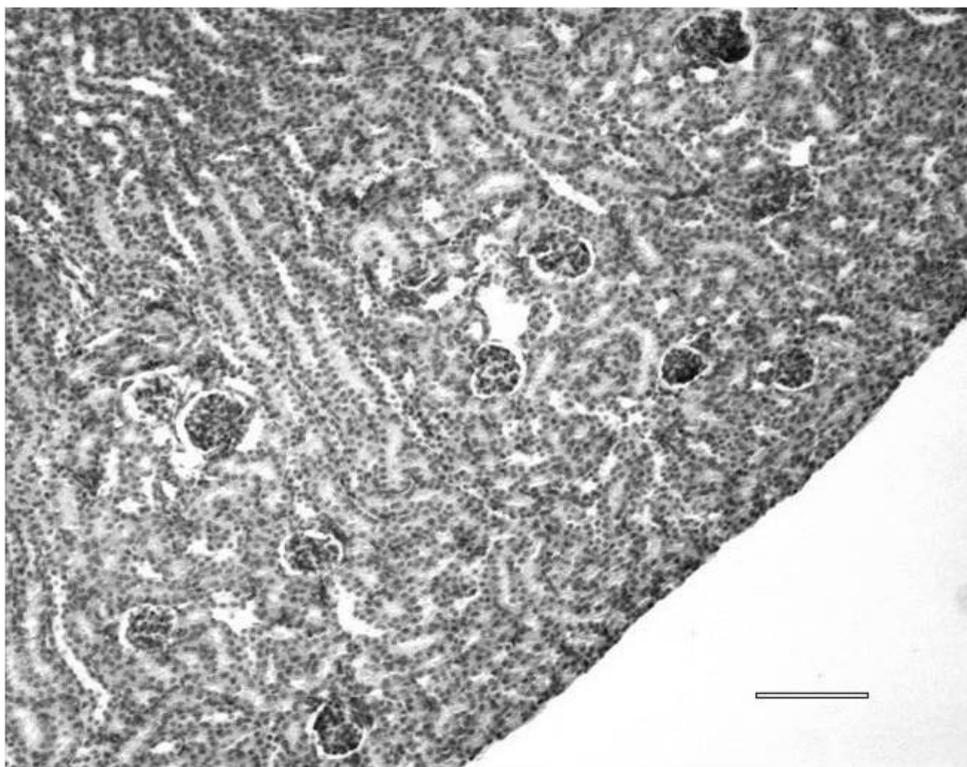


Abbildung 3.54: Ausschnitt der Niere einer C57/BL6-Maus, behandelt mit $10 \text{ mg/kg}\cdot\text{KG}$ Valdecoxib über 21 Tage an Tag P21, Balken entspr. $100 \mu\text{m}$, $200 \times$ vergrößert, HE-Färbung. Zu sehen sind verglichen mit Abb. 3.6 zu kleine Glomeruli im äußeren Kortex.

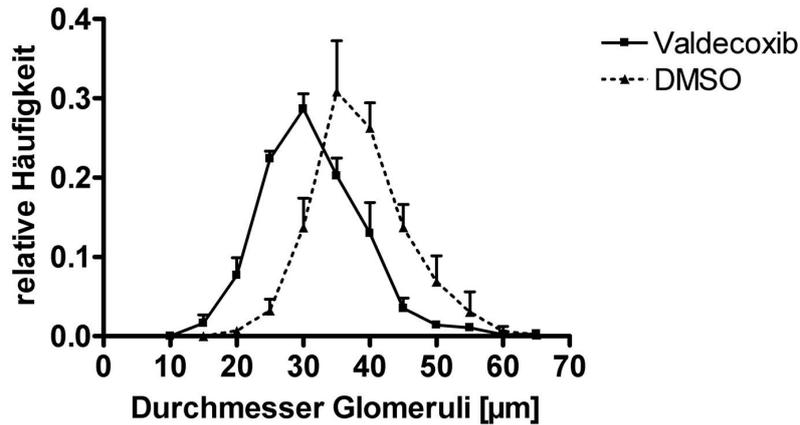


Abbildung 3.55: Verteilungskurve der relativen Häufigkeiten der Glomeruli \pm SEM von C57/BL6-Mäusen, behandelt mit 10 mg/kg·KG Valdecoxib und behandelt mit gleichen Volumina DMSO über 21 Tage an Tag P21.

3.4 Klassische NSAIDs

3.4.1 Diclofenac

Diclofenac wurde in einer Konzentration von 20 mg/kg·KG über 21 Tage verabreicht. Der Nierenquotient lag bei $14,66 \pm 0,2$ im Vergleich zu $17,48 \pm 0,6$ bei der Referenzgruppe ($p < 0,01$, $n = 3$). Der mittlere Durchmesser der Glomeruli betrug $(31,55 \pm 0,4) \mu\text{m}$ versus $(41,18 \pm 1,5) \mu\text{m}$ in der Referenzgruppe ($p < 0,01$, $n = 3$). Die kortikale Dicke betrug bei den mit Diclofenac behandelten Tieren $(31,62 \pm 2,2) \mu\text{m}$ und war damit signifikant dünner als die der Referenzgruppe, die bei $(45,41 \pm 2,0) \mu\text{m}$ lag ($p < 0,05$, $n = 3$). Der Anteil der Glomeruli im Rindenbereich von $58 \mu\text{m}$ betrug $(30,99 \pm 1,5)\%$ versus $(13,45 \pm 1,1)\%$ in der Referenzgruppe ($p < 0,01$, $n = 3$) (vgl. Abb. 3.56 - 3.60).

In der Verteilungskurve fand sich das Maximum in der Prüfgruppe bei etwa $25 \mu\text{m}$ im Vergleich zu $35 \mu\text{m}$ in der Referenzgruppe, ansonsten zeigte sich im Bereich, hoher Durchmesser ein flacherer Verlauf der Prüfgruppe (vgl. Abb. 3.61).

3.4.2 Naproxen

Die Konzentration von Naproxen lag bei 50 mg/kg·KG. Die Substanz wurde ebenfalls über 21 Tage verabreicht. Der Nierenquotient lag bei den mit Naproxen behandelten Tieren bei $14,74 \pm 0,3$ versus $17,48 \pm 0,6$ bei der Referenzgruppe ($p < 0,01$, $n = 3$) (vgl. Abb. 3.62).

Der mittlere Durchmesser der Glomeruli lag in der Prüfgruppe bei $(28,71 \pm 0,7) \mu\text{m}$ und war damit signifikant niedriger als in der Referenzgruppe, deren mittlerer Durchmesser der Glomeruli bei $(41,18 \pm 1,5) \mu\text{m}$ ($p < 0,01$, $n = 3$) lag. Auch die kortikale Dicke zeigte einen signifikanten Unterschied zur

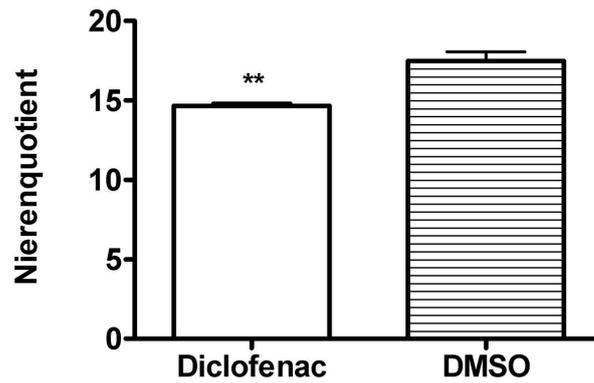


Abbildung 3.56: Nierenquotienten an Tag P21 von C57/BL6-Mäusen, behandelt mit 20 mg/kg·KG Diclofenac und behandelt mit gleichen Volumina DMSO über 21 Tage. Es zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen beiden Gruppen. Dargestellt ist der Nierenquotient \pm SEM. (** $p < 0,01$, $n = 3$)

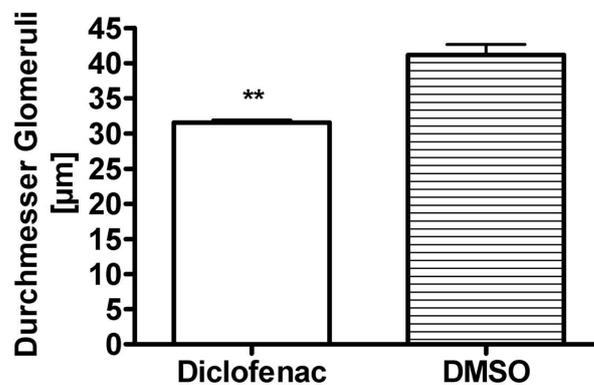


Abbildung 3.57: Die mittleren Durchmesser der Glomeruli von an Tag P21 entnommenen Nieren aus C57/BL6-Mäusen, behandelt mit 20 mg/kg·KG Diclofenac und behandelt mit gleichen Volumina DMSO über 21 Tage. Es zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen beiden Gruppen. Dargestellt sind die Durchmesser \pm SEM. (** $p < 0,01$, $n = 3$)

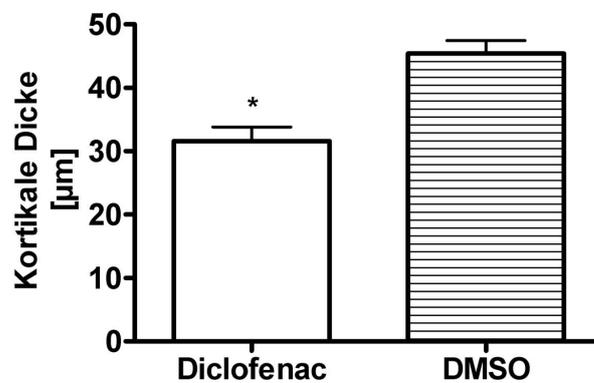


Abbildung 3.58: Die kortikale Dicke von Nieren aus C57/BL6-Mäusen, behandelt mit 20 mg/kg·KG Diclofenac und behandelt mit gleichen Volumina DMSO über 21 Tage an Tag P21. Es zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen beiden Gruppen. Dargestellt sind die kortikalen Dicken \pm SEM. (* $p < 0,05$, $n = 3$)

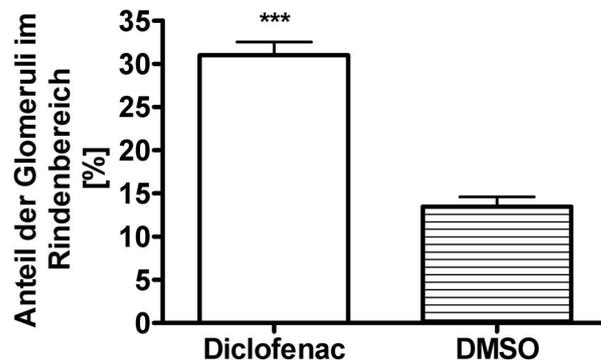


Abbildung 3.59: Darstellung der Anteile der Glomeruli im Rindbereich innerhalb $58 \mu\text{m}$ an Tag P21 von C57/BL6-Mäusen, behandelt mit $20 \text{ mg/kg} \cdot \text{KG}$ Diclofenac und behandelt mit gleichen Volumina DMSO über 21 Tage. Es zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen beiden Gruppen. Dargestellt ist der prozentuale Anteil der Glomeruli im Rindbereich von $58 \mu\text{m} \pm \text{SEM}$. (***) $p < 0,001$, $n = 3$)

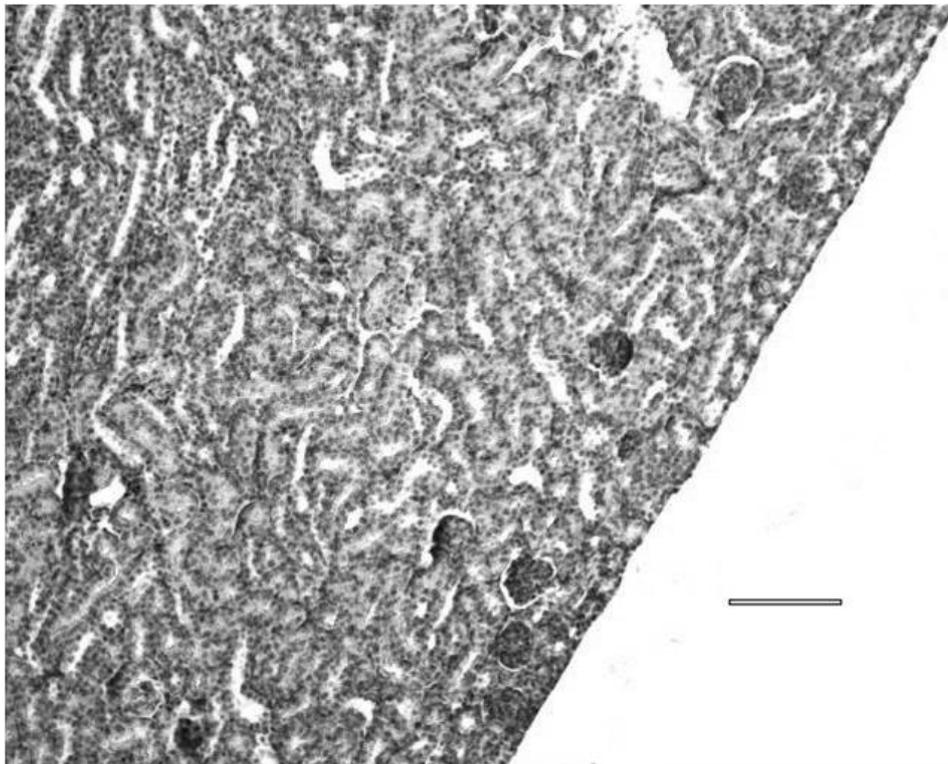


Abbildung 3.60: Ausschnitt der Niere einer C57/BL6-Maus, behandelt mit $20 \text{ mg/kg} \cdot \text{KG}$ Diclofenac über 21 Tage an Tag P21, Balken entspr. $100 \mu\text{m}$, $200 \times$ vergrößert, HE-Färbung. Zu sehen sind zu kleine Glomeruli im subkapsulären Bereich.

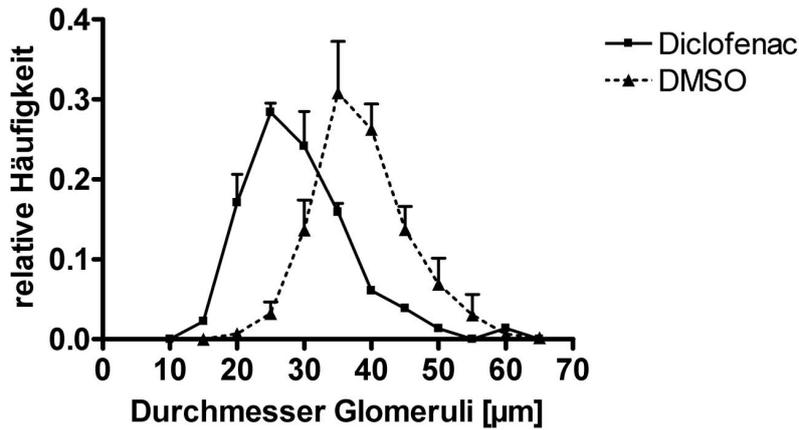


Abbildung 3.61: Verteilungskurve der relativen Häufigkeiten der Glomeruli \pm SEM von C57/BL6-Mäusen, behandelt mit 20 mg/kg·KG Diclofenac und behandelt mit gleichen Volumina DMSO über 21 Tage an Tag P21.

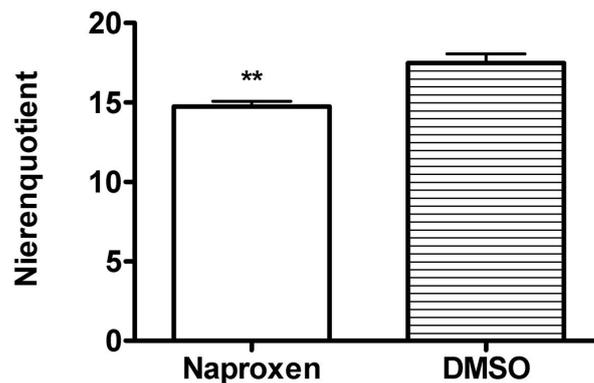


Abbildung 3.62: Nierenquotienten an Tag P21 von C57/BL6-Mäusen, behandelt mit 50 mg/kg·KG Naproxen und behandelt mit gleichen Volumina DMSO über 21 Tage am postpartalen Tag P21. Es zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen beiden Gruppen. Dargestellt ist der Nierenquotient \pm SEM. (** $p < 0,01$, $n = 3$)

Referenzgruppe, bei den mit Naproxen behandelten Mäusen lag sie bei $(33,61 \pm 1,4) \mu\text{m}$ versus $(45,41 \pm 2,0) \mu\text{m}$ in der Referenzgruppe ($p < 0,01$, $n = 3$). Der Anteil der Glomeruli im Rindenbereich bis $58 \mu\text{m}$ lag signifikant über der Referenzgruppe mit einem Anteil von $(24,14 \pm 3,0)\%$ im Gegensatz zu $(13,45 \pm 1,1)\%$ in der Referenzgruppe ($p < 0,05$, $n = 3$) (vgl. Abb. 3.63 - 3.66).

Bei der Verteilungskurve der Glomeruli fand sich das Maximum bei etwa $25 \mu\text{m}$ versus etwa $35 \mu\text{m}$ in der Referenzgruppe (vgl. Abb. 3.67).

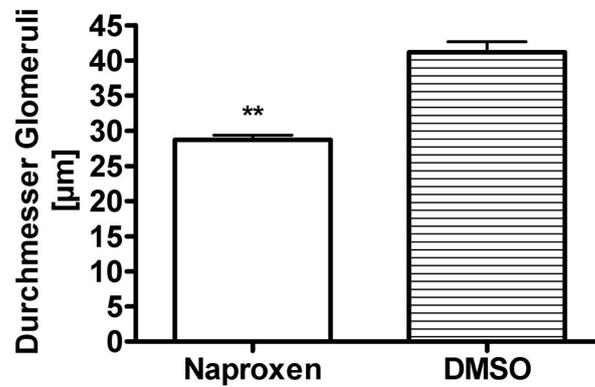


Abbildung 3.63: Die mittleren Durchmesser der Glomeruli von Nieren aus C57/BL6-Mäusen, behandelt mit 50 mg/kg·KG Naproxen und behandelt mit gleichen Volumina DMSO über 21 Tage, am postpartalen Tag P21 entnommen. Es zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen beiden Gruppen. Dargestellt sind die Durchmesser \pm SEM. (** $p < 0,01$, $n = 3$)

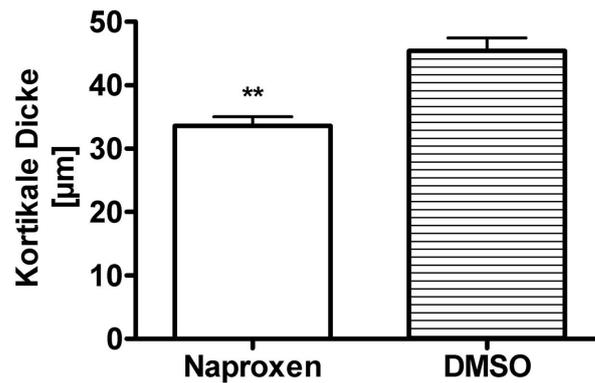


Abbildung 3.64: Die kortikale Dicke an Tag P21 von Nieren aus C57/BL6-Mäusen, behandelt mit 50 mg/kg·KG Naproxen und behandelt mit gleichen Volumina DMSO über 21 Tage. Es zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen beiden Gruppen. Dargestellt sind die kortikalen Dicken \pm SEM. (** $p < 0,01$, $n = 3$)

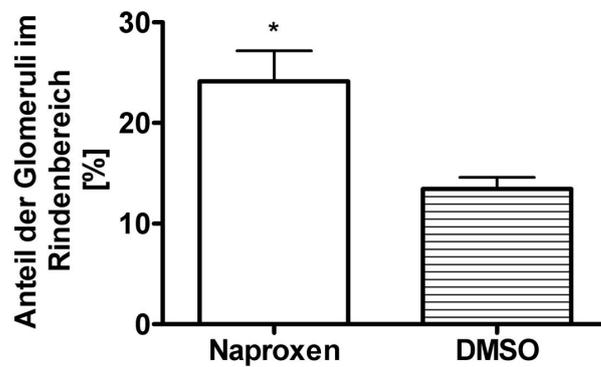


Abbildung 3.65: Darstellung der Anteile der Glomeruli im Rindbereich innerhalb $58 \mu\text{m}$ an Tag P21 von C57/BL6-Mäusen, behandelt mit $50 \text{ mg/kg}\cdot\text{KG}$ Naproxen und behandelt mit gleichen Volumina DMSO über 21 Tage. Es zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen beiden Gruppen. Dargestellt ist der prozentuale Anteil der Glomeruli im Rindbereich von $58 \mu\text{m} \pm \text{SEM}$. (* $p < 0,05$, $n = 3$)

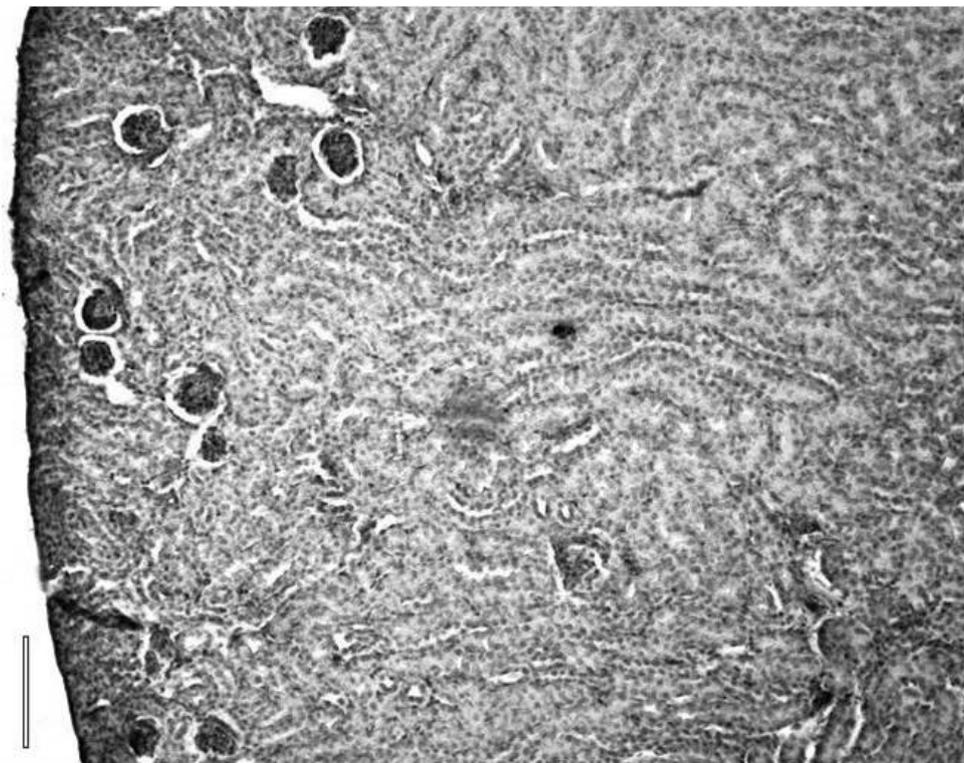


Abbildung 3.66: Ausschnitt der Niere einer C57/BL6-Maus, behandelt mit $50 \text{ mg/kg}\cdot\text{KG}$ Naproxen über 21 Tage an Tag P21, Balken entspr. $100 \mu\text{m}$, $200 \times$ vergrößert, HE-Färbung. Verglichen mit Abb. 3.6 sieht man zu kleine Glomeruli, die im subkapsulären Bereich liegen.

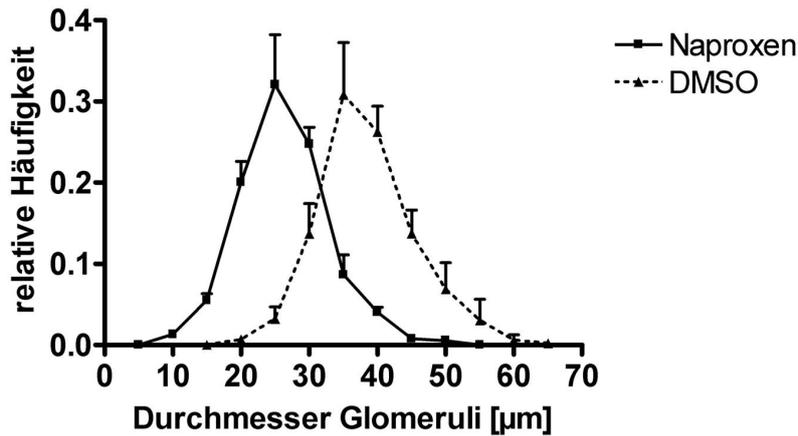


Abbildung 3.67: Verteilungskurve der relativen Häufigkeiten der Glomeruli \pm SEM von C57/BL6-Mäusen, behandelt mit 50 mg/kg-KG Naproxen und behandelt mit gleichen Volumina DMSO über 21 Tage.

3.5 Selektiver COX-1-Inhibitor

3.5.1 SC-560

Ziel dieser Versuchsreihe war zu sehen, ob die Hemmung der COX-1 Effekte auf die Nephrogenese ähnlich denen der COX-2-Inhibitoren und unselektiven COX-Inhibitoren zeigt. SC-560 ist ein selektiver COX-1-Inhibitor und wurde in einer Konzentration von 20 mg/kg-KG über 21 Tage verabreicht.

Alle erhobenen Parameter zeigten keine signifikanten Unterschiede zur Referenzgruppe. Der Nierenquotient lag bei $16,5 \pm 0,3$ versus $17,48 \pm 0,6$ in der Referenzgruppe ($p = 1414$, $n = 5$). Der mittlere Durchmesser der Glomeruli betrug $(37,8 \pm 1,1) \mu\text{m}$ im Vergleich dazu betrug er in der Referenzgruppe $(41,18 \pm 1,5) \mu\text{m}$ ($p = 0,1409$, $n = 3$). Die kortikale Dicke war $(45,62 \pm 3,6) \mu\text{m}$ versus $(45,41 \pm 2,0) \mu\text{m}$ in der Referenzgruppe ($p = 0,961$, $n = 3$). Auch im Anteil der Glomeruli im Rindenbereich von $58 \mu\text{m}$ zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen mit SC-560 behandelten Tieren und der Referenzgruppe. Der Anteil lag in der Prüfgruppe bei $(12,73 \pm 1,5)\%$ im Vergleich zu $(13,45 \pm 1,1)\%$ in der Referenzgruppe ($p = 0,718$, $n = 3$) (vgl. Abb. 3.68 - 3.72).

Das Maximum in der Verteilungskurve der Glomeruli fand sich genau wie, das der Referenzgruppe bei etwa $35 \mu\text{m}$, allerdings war die Kurve der mit SC-560 behandelten Tiere im Bereich des Maximums flacher und die gesamte Kurve war minimal ($<5 \mu\text{m}$) nach links verschoben (vgl. Abb. 3.73).

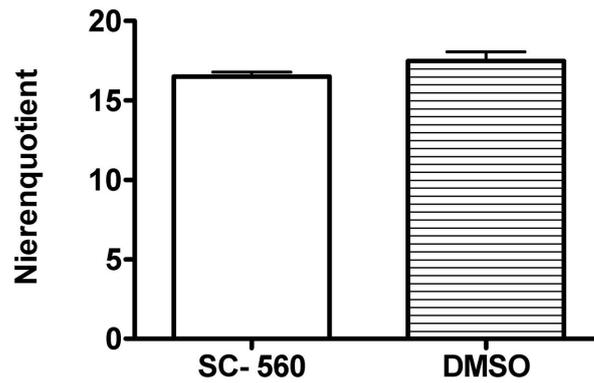


Abbildung 3.68: Nierenquotienten an Tag P21 von C57/BL6-Mäusen, behandelt mit 20 mg/kg·KG SC-560 und behandelt mit gleichen Volumina DMSO über 21 Tage. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen beiden Gruppen. Dargestellt ist der Nierenquotient \pm SEM. ($p > 0,05$, $n = 3$)

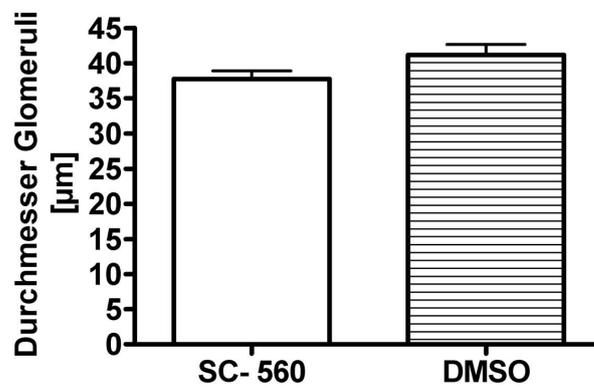


Abbildung 3.69: Die mittleren Durchmesser der Glomeruli von an Tag P21 entnommenen Nieren aus C57/BL6-Mäusen, behandelt mit 20 mg/kg·KG SC-560 und behandelt mit gleichen Volumina DMSO über 21 Tage. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen beiden Gruppen. Dargestellt sind die Durchmesser \pm SEM. ($p > 0,05$, $n = 3$)

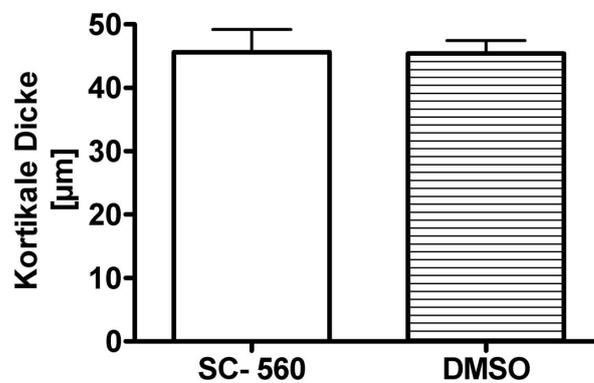


Abbildung 3.70: Die kortikale Dicke von Nieren aus C57/BL6-Mäusen, behandelt mit 20 mg/kg·KG SC-560 und behandelt mit gleichen Volumina DMSO über 21 Tage an Tag P21. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen beiden Gruppen. Dargestellt sind die kortikalen Dicken \pm SEM. ($p > 0,05$, $n = 3$)

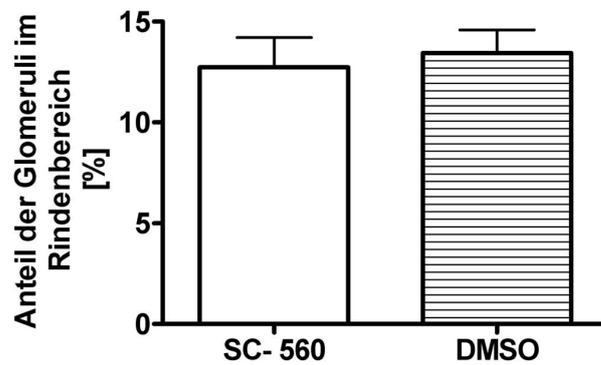


Abbildung 3.71: Darstellung der Anteile der Glomeruli im Rindbereich innerhalb $58 \mu\text{m}$ von C57/BL6-Mäusen, behandelt mit $20 \text{ mg/kg}\cdot\text{KG}$ SC-560 und behandelt mit gleichen Volumina DMSO über 21 Tage an Tag P21. Es zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen beiden Gruppen. Dargestellt ist der prozentuale Anteil der Glomeruli im Rindbereich von $58 \mu\text{m} \pm \text{SEM}$. ($p > 0,05$, $n = 3$)

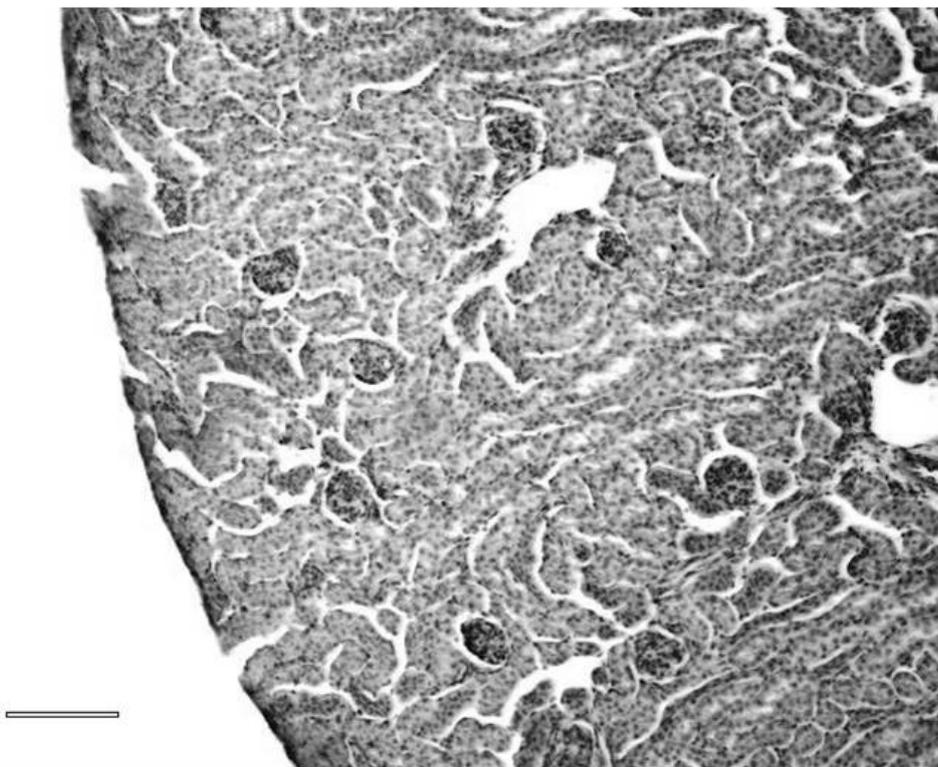


Abbildung 3.72: Ausschnitt der Niere einer C57/BL6-Maus, behandelt mit $20 \text{ mg/kg}\cdot\text{KG}$ SC-560 über 21 Tage an Tag P21, Balken entspr. $100 \mu\text{m}$, $200 \times$ vergrößert, HE-Färbung. Man sieht verglichen mit Abb. 3.6 ein ähnliches Bild. Die Glomeruli liegen überwiegend im inneren Kortex und Markbereich.

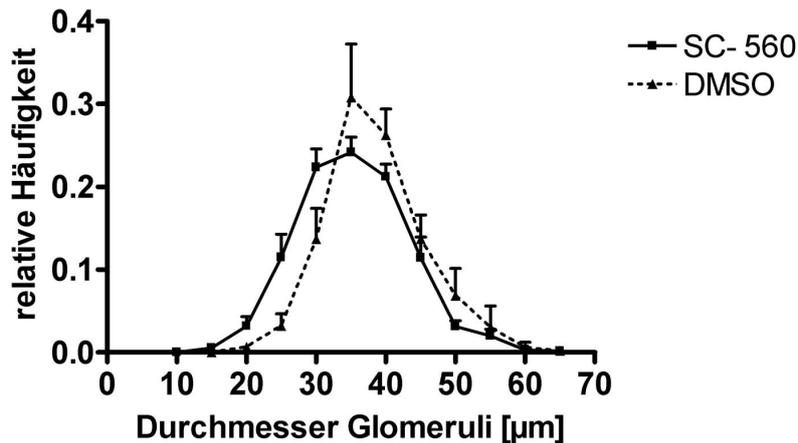


Abbildung 3.73: Verteilungskurve der relativen Häufigkeiten der Glomeruli \pm SEM von C57/BL6-Mäusen, behandelt mit 20 mg/kg·KG SC-560 und behandelt mit gleichen Volumina DMSO über 21 Tage an Tag P21.

3.6 DMC: Ein Celecoxib-Derivat, ohne Hemmpotenz für die COX

3.6.1 DMC

DMC ist ein Coxib, welches eine ähnliche Strukturformel hat wie Celecoxib, allerdings nicht die COX-2 hemmt. DMC wurde in der gleichen Konzentration wie Celecoxib eingesetzt, also 100 mg/kg·KG über 21 Tage. Ziel war hierbei, zu zeigen, dass die bisher gezeigten Effekte auf einer Hemmung der COX-2 beruhen. Wie auch bei SC-560 zeigten sich in dieser Versuchreihe keine signifikanten Veränderungen zwischen Prüfgruppe und Referenzgruppe.

Der Nierenquotient betrug $15,87 \pm 0,4$ versus $17,48 \pm 0,6$ in der Referenzgruppe ($p = 0,0734$, $n = 4$). Der mittlere Durchmesser der Glomeruli lag bei $(39,35 \pm 1,3) \mu\text{m}$ im Vergleich zu $(41,18 \pm 1,5) \mu\text{m}$ ($p = 0,407$, $n = 3$). Die kortikale Dicke betrug $(45,92 \pm 2,2) \mu\text{m}$ versus $(45,41 \pm 2,0) \mu\text{m}$ in der Referenzgruppe ($p = 0,873$, $n = 3$). Der Anteil der Glomeruli im Rindenbereich von $58 \mu\text{m}$ war $(11,4 \pm 1,7)\%$ im Vergleich zu $(13,45 \pm 1,1)\%$ in der Referenzgruppe ($p = 3693$, $n = 3$) (vgl. Abb. 3.74 - 3.78).

Die Verteilungskurve der Durchmesser der Glomeruli hatte ein gemeinsames Maximum bei etwa $35 \mu\text{m}$, auch der restliche Kurvenverlauf deckte sich weitestgehend (vgl. Abb. 3.79).

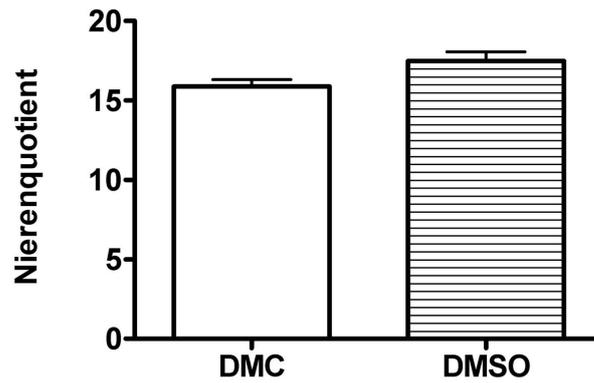


Abbildung 3.74: Nierenquotienten an Tag P21 von C57/BL6-Mäusen, behandelt mit 100 mg/kg·KG Dimethylcelecoxib (DMC) und behandelt mit gleichen Volumina DMSO über 21 Tage. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen beiden Gruppen. Dargestellt ist der Nierenquotient \pm SEM. ($p > 0,05$, $n = 3$)

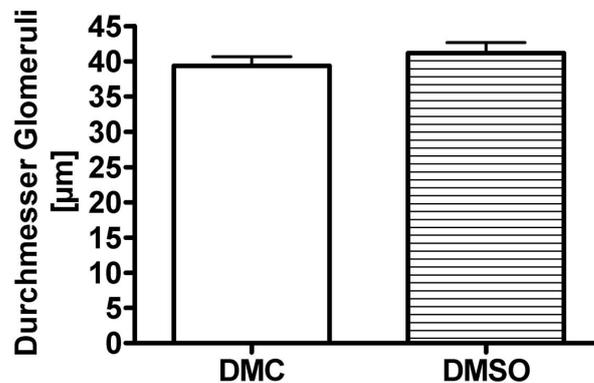


Abbildung 3.75: Die mittleren Durchmesser der Glomeruli von an Tag P21 entnommenen Nieren aus C57/BL6-Mäusen, behandelt mit 100 mg/kg·KG Dimethylcelecoxib (DMC) und behandelt mit gleichen Volumina DMSO über 21 Tage. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen beiden Gruppen. Dargestellt sind die Durchmesser \pm SEM. ($p > 0,05$, $n = 3$)

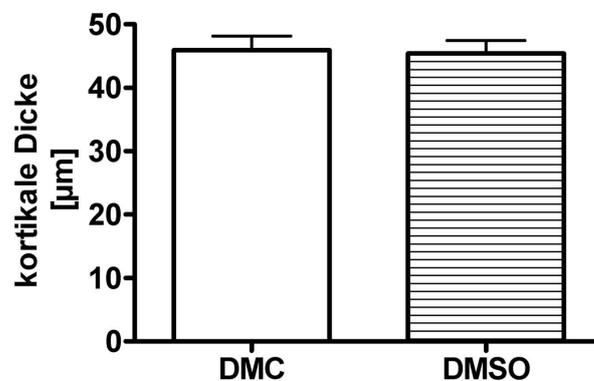


Abbildung 3.76: Die kortikale Dicke von Nieren aus C57/BL6-Mäusen, behandelt mit 100 mg/kg·KG Dimethylcelecoxib (DMC) und behandelt mit gleichen Volumina DMSO über 21 Tage an Tag P21. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen beiden Gruppen. Dargestellt sind die kortikalen Dicken \pm SEM. ($p > 0,05$, $n = 3$)

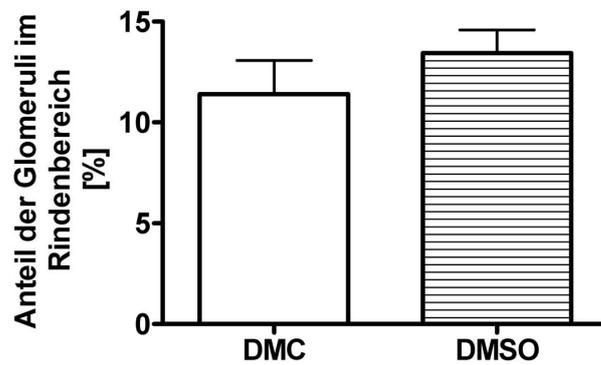


Abbildung 3.77: Darstellung der Anteile der Glomeruli im Rindenbereich innerhalb $58 \mu\text{m}$ von C57/BL6-Mäusen, behandelt mit $100 \text{ mg/kg}\cdot\text{KG}$ Dimethylcelecoxib (DMC) und behandelt mit gleichen Volumina DMSO über 21 Tage. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen beiden Gruppen. Dargestellt ist der prozentuale Anteil der Glomeruli im Rindenbereich von $58 \mu\text{m} \pm \text{SEM}$. ($p > 0,05$, $n = 3$)

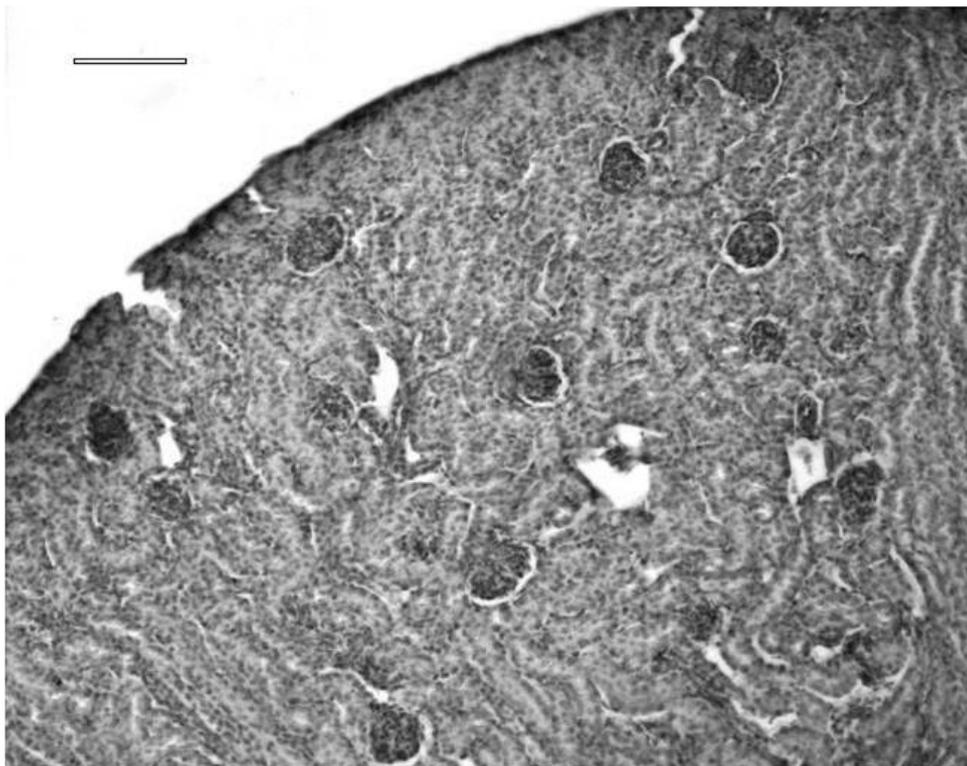


Abbildung 3.78: Ausschnitt der Niere einer C57/BL6-Maus, behandelt mit $100 \text{ mg/kg}\cdot\text{KG}$ DMC über 21 Tage an Tag P21, Balken entspr. $100 \mu\text{m}$, $200 \times$ vergrößert, HE-Färbung. Verglichen mit Abb. 3.6 sieht man ebenfalls normal große Glomeruli, die überwiegend im inneren Kortex und Markbereich liegen.

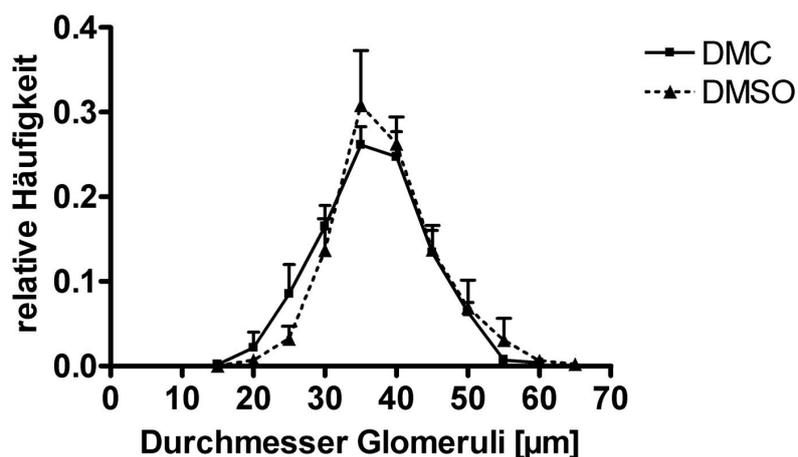


Abbildung 3.79: Verteilungskurve der relativen Häufigkeiten der Glomeruli \pm SEM von C57/BL6-Mäusen, behandelt mit 100 mg/kg-KG Dimethylcelecoxib (DMC) und behandelt mit gleichen Volumina DMSO über 21 Tage an Tag P21.

3.7 Zusammenstellung der Ergebnisse aus Abschnitt 3.1 bis 3.6

	Nierengewicht/ Körpergewicht [$\times 10^{-3}$]	Durchmesser [μm]	Kortikale Dicke [μm]	Anteil der Glome- ruli im Rindenbe- reich [%]
Referenzgruppe	17,48 \pm 0,6	41,18 \pm 1,5	45,41 \pm 2,0	13,45 \pm 1,1
COX-2 ^{-/-}	9,217 \pm 0,2	23,55 \pm 0,6	10,73 \pm 0,3	68,51 \pm 2,0
SC-236	11,50 \pm 0,4	28,87 \pm 0,7	15,59 \pm 2,1	40,58 \pm 1,5
SC-791	14,24 \pm 0,1	30,61 \pm 1,3	27,3 \pm 2,3	26,64 \pm 3,6
Celecoxib	16,27 \pm 0,5	33,85 \pm 0,9	40,65 \pm 1,1	13,19 \pm 0,9
Etoricoxib	14,17 \pm 0,4	29,88 \pm 0,6	29,60 \pm 2,2	23,45 \pm 1,4
Lumiracoxib	14,44 \pm 0,1	31,35 \pm 1,7	34,51 \pm 1,0	21,86 \pm 1,8
Rofecoxib	13,87 \pm 0,1	29,56 \pm 1,3	31,95 \pm 3,0	17,86 \pm 0,8
Valdecoxib	16,29 \pm 0,3	34,08 \pm 0,8	34,99 \pm 1,3	18,37 \pm 0,8
Diclofenac	14,66 \pm 0,2	31,55 \pm 0,4	31,62 \pm 2,2	30,99 \pm 1,5
Naproxen	14,74 \pm 0,3	28,71 \pm 0,7	33,61 \pm 1,4	24,14 \pm 3,0
SC-560	16,50 \pm 0,3	37,80 \pm 1,1	45,62 \pm 3,6	12,73 \pm 1,5
DMC	15,87 \pm 0,4	39,35 \pm 1,3	45,92 \pm 2,2	11,40 \pm 1,7

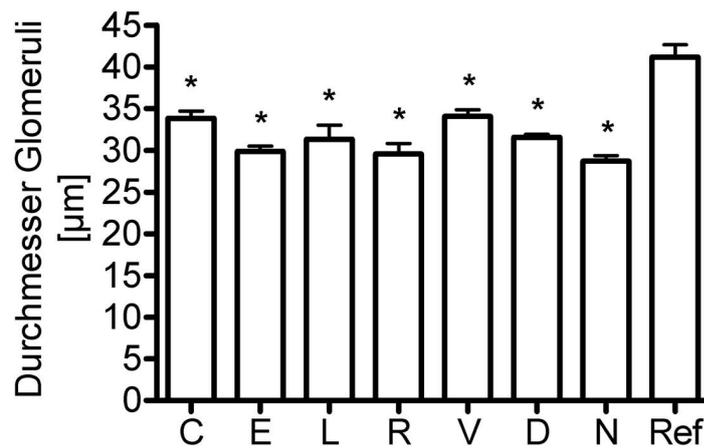


Abbildung 3.80: Darstellung der mittleren Durchmesser der Glomeruli aller verabreichten Coxibe und NSAIDs. Alle Substanzen wurden über 21 Tage verabreicht. Die Referenzgruppe erhielt über 21 Tage DMSO, das als Lösungsmittel aller Prüfsubstanzen verwendet wurde. An Tag P21 wurden die Tiere getötet und die Nieren entnommen. Die Prüfsubstanzen zeigen alle einen signifikanten Unterschied zur Referenzgruppe, untereinander gibt es keine signifikanten Unterschiede. Signifikanzen wurden mittels ANOVA und Bonferroni Gruppenvergleich berechnet. Dargestellt sind die mittleren Durchmesser \pm SEM (* $p < 0,05, n = 3$), Abk.: C = Celecoxib 100 mg/kg·KG, E = Etoricoxib 35 mg/kg·KG, L = Lumiracoxib 50 mg/kg·KG, R = Rofecoxib 10 mg/kg·KG, V = Valdecoxib 10 mg/kg·KG, D = Diclofenac 20 mg/kg·KG, N = Naproxen 50 mg/kg·KG, Ref = Referenzgruppe.

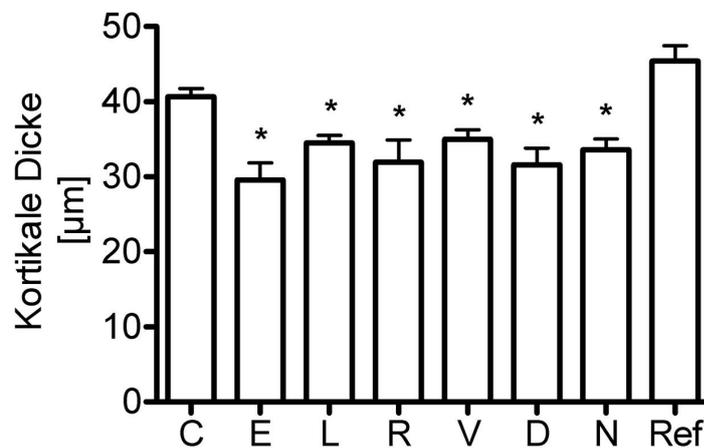


Abbildung 3.81: Darstellung der kortikalen Dicke aller verabreichten Coxibe und NSAIDs. Alle Substanzen wurden über 21 Tage verabreicht. Die Referenzgruppe erhielt über 21 Tage DMSO, das als Lösungsmittel aller Prüfsubstanzen verwendet wurde. An Tag P21 wurden die Tiere getötet und die Nieren entnommen. Die Prüfsubstanzen zeigen alle, außer Celecoxib einen signifikanten Unterschied zur Referenzgruppe, untereinander gibt es zwischen Celecoxib und Etoricoxib einen signifikanten Unterschied. Signifikanzen wurden mittels ANOVA und Bonferroni Gruppenvergleich berechnet. Dargestellt ist die kortikale Dicke \pm SEM (* $p < 0,05, n = 3$), Abk.: C = Celecoxib 100 mg/kg·KG, E = Etoricoxib 35 mg/kg·KG, L = Lumiracoxib 50 mg/kg·KG, R = Rofecoxib 10 mg/kg·KG, V = Valdecoxib 10 mg/kg·KG, D = Diclofenac 20 mg/kg·KG, N = Naproxen 50 mg/kg·KG, Ref = Referenzgruppe.

3.8 Kinetik: COX-2-Expression von unbehandelten Tieren

Die Mausniere entwickelt sich noch ca. zwei Wochen postpartal weiter. Das Ziel der folgenden Versuche war nun zu sehen, wie die COX-2 Expression und der Gehalt an COX-2-Protein in der sich entwickelnden Niere ist und wie sie sich verändern. Aus der Arbeit von Kömhoff *et al.* [128] gibt es Hinweise, dass die COX-2 an den ersten Lebenstagen der Mäuse erhöht ist. Anhand dieser Anhaltspunkte sollte später gezeigt werden, in welchem Zeitfenster die COX-Hemmung, bzw. die Coxib-Applikation eventuell kritisch sein könnte. Die unbehandelten C57/BL6-Mäuse wurden an den Tagen P2, P4, P6, P8 und P21 getötet und deren Nieren entnommen.

3.8.1 Quantitative TaqMan RT-PCR an Tag P2, P4, P6, P8 und P21

Es erfolgte eine quantitative TaqMan RT-PCR von aus Nierengewebe extrahierter mRNA, verglichen mit einem internen Standard, 18S-rRNA. In jedem Versuch wurde ein Triplet jeder Versuchsgruppe gemessen und es erfolgten jeweils drei Versuchsreihen so dass jeweils neun Werte jeder Gruppe in der Statistik verrechnet wurden. Die relative COX-2-mRNA-Expression der Nieren der unterschiedlich alten Mäusen wurde auf den Gehalt an COX-2-mRNA in Nierengewebe an Tag P21 bezogen. Die Expression an Tag P21 wurde als 1,0 definiert. An Tag P2 war die COX-2-mRNA-Expression nicht signifikant erhöht gegenüber Tag P21. Der Quotient aus COX-2-mRNA-Expression und 18S-rRNA-Expression betrug $1,31 \pm 0,1$ versus 1,0 an Tag P21 ($p > 0,05$, $n = 3$). Die COX-2-mRNA-Expression an Tag P4 war verglichen mit der an Tag P21 signifikant erhöht. Ihr Wert betrug $3,107 \pm 0,8$ gegenüber 1,0 an Tag P21 ($p < 0,05$, $n = 3$). An Tag P6 und P8 war die COX-2-mRNA-Expression nicht signifikant erhöht gegenüber an Tag P21. Der Quotient lag an Tag P6 bei $1,362 \pm 0,4$ ($p > 0,05$, $n = 3$) und an Tag P8 bei $0,99 \pm 0,2$ ($p > 0,05$, $n = 3$) versus 1,0 an Tag P21 (siehe Abb. 3.82).

3.8.2 Western Blot-Analyse an Tag P2, P4, P6, P8 und P21

Von extrahierter Membranproteinfraktion aus Nierengewebe wurden Western Blot-Analysen mit jeweils 50 μg Gesamtproteingehalt durchgeführt. In den mit dem Odyseyscanner aufgenommenen Bildern wurden mit Hilfe der Image J Software die Grauwerte gemessen und die „Area under the curve“ (AUC) bestimmt, die mit der Graphpad 4-Software ausgewertet wurden. Die statistische Auswertung erfolgte jeweils mittels One-way-ANOVA und Bonferronis multiple Comparison-Test von Tag P2, P4, P6 und P8 verglichen jeweils mit Tag P21. An Tag P2 lag die AUC bei 3987 ± 596 verglichen mit 3183 ± 1099 an Tag P21 ($p > 0,05$, $n = 5$) und war damit nicht signifikant verschieden. Der Wert der AUC betrug an Tag P4 7037 ± 1028 ($p > 0,05$, $n = 5$) und ist damit zwar tendenziell erhöht, jedoch zeigte sich keine Signifikanz, an Tag P6 betrug die AUC 7715 ± 1481 ($p < 0,05$, $n = 5$) und

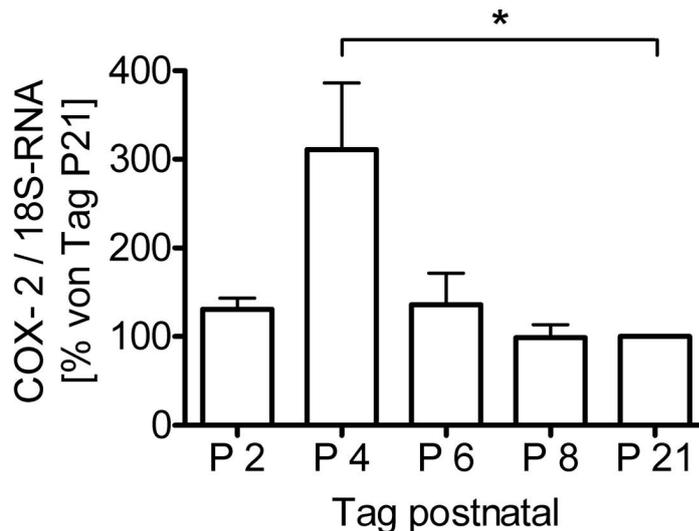


Abbildung 3.82: Darstellung der relativen Expression von COX-2-mRNA in Nierengewebe zu 18S-RNA un behandelter C57/BL6-Mäusen an den postpartalen Tagen P2, P4, P6 und P8, jeweils bezogen auf die Expression an Tag P21. Signifikanzen wurden mittels One-way-ANOVA und Bonferroni Korrektur ermittelt. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM. (* $p < 0,05$, $n = 3$)

war damit signifikant erhöht. An Tag P8 lag der Wert der AUC ebenfalls tendenziell über dem von Tag P21 bei 6214 ± 711 ($p > 0,05$, $n = 5$), zeigte jedoch keine Signifikanz gegenüber Tag P21, deren Wert bei 3183 ± 1099 lag (siehe Abb. 3.83 und Abb. 3.84).

3.9 Kinetik: Behandlung mit SC-236 von Tag P1 bis P6 versus bis P21

In der vorangehenden Versuchreihe konnte gezeigt werden, dass in den ersten Lebenstagen die COX-2 im Nierengewebe hochreguliert wird. In der nun folgenden Versuchsreihe sollte gezeigt werden, ob durch Hemmung der COX-2 in den ersten sechs Lebenstagen die Nephrogenese gestört abläuft. Hierfür wurde eine Gruppe von C57/BL6-Mäusen von Tag P1 bis Tag P6 mit SC-236 in einer Konzentration von 20 mg/kg·KG behandelt. An den übrigen Tagen bis Tag P21 erhielt diese Gruppe DMSO in äquivalenten Volumina, während eine zweite Gruppe von Mäusen über den gesamten Zeitraum von drei Wochen (Tag P1 bis Tag P21) mit SC-236 in der gleichen Konzentration (20 mg/kg·KG) behandelt wurde. Der Nierenquotient lag bei den Tieren von Tag P1 bis P6 behandelt an Tag P21 bei $12,36 \pm 0,4$ und war somit signifikant niedriger als bei der Referenzgruppe, bei der dieser Wert $17,48 \pm 0,6$ betrug ($p < 0,001$, $n = 3$). Auch der Nierenquotient von Tieren, die von Tag P1 bis P21 ($11,5 \pm 0,4$, $p < 0,001$, $n = 3$) behandelt wurden, war signifikant verschieden zu dem der Referenzgruppe, allerdings nicht von der P1-P6 gespritzten Gruppe (vgl. Abb. 3.85).

Der mittlere Durchmesser der Glomeruli war bei den von Tag P1 bis P6 behandelten Tieren signifikant

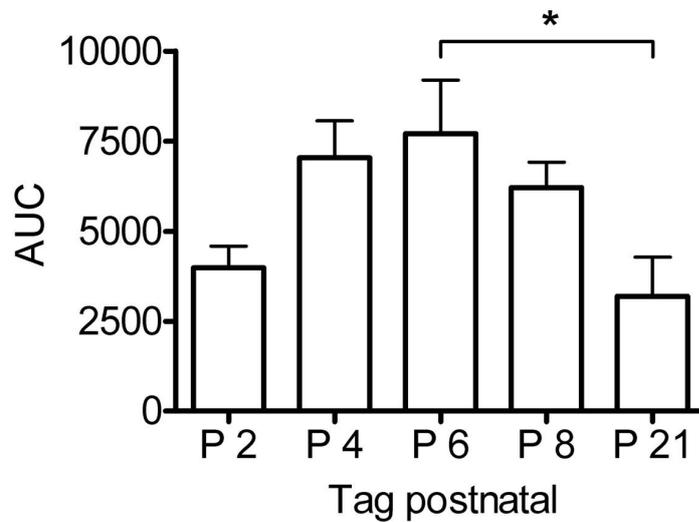


Abbildung 3.83: Der COX-2-Proteingehalt in Nierengewebe un behandelter C57/BL6-Mäusen an den postpartalen Tagen P2, P4, P6, P8 und P21. Es wurde jeweils 50 g Membranprotein eingesetzt. Darstellung der Mittelwerte der AUC \pm SEM von Graustufen auf Western Blots, gemessen mit Image J Software. Signifikanzen wurden mittels One-way-ANOVA und Bonferroni Korrektur berechnet. (* $p < 0,05$, $n = 5$)

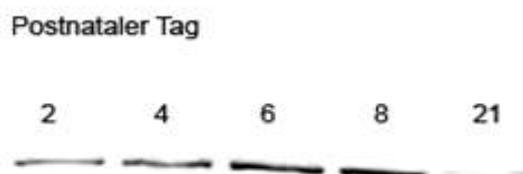


Abbildung 3.84: Darstellung eines Western Blots. Aufgetragen wurden jeweils 50 μ g Protein der Membranproteinfraktion aus Nierengewebe un behandelter C57/BL6-Mäuse isoliert, die an den postnatalen Tagen P2, P4, P6, P8 und P21 getötet wurden. Zur Darstellung der Banden wurde Ziege-anti-COX-2 IgG und Esel-anti-Ziege IgG gekoppelt mit einem Farbstoff, dessen Absorptionsmaximum bei 680 nm lag, verwendet. Die Nitrocellulosemembran wurde mit einem Odyssey-Scanner aufgenommen. Gut zu sehen ist der Anstieg des Proteingehaltes an Tag P4, P6 und P8 im Vergleich zu Tag P21.

niedriger als bei der Referenzgruppe. Der Wert lag bei der Gruppe von Tag P1 bis P6 behandelt bei $(30,43 \pm 0,5) \mu\text{m}$ versus $(41,18 \pm 1,5) \mu\text{m}$ in der Referenzgruppe ($p < 0,01$, $n = 3$). Zwischen den Tieren von Tag P1 bis P6 und drei Wochen behandelten Tieren (P1-P21) gab es keinen signifikanten Unterschied ($p > 0,05$, $n = 3$) (vgl. Abb. 3.86).

Die kortikale Dicke betrug bei den Tieren, von Tag P1 bis P6 behandelt, $(21,22 \pm 0,5) \mu\text{m}$ und war damit signifikant reduziert, verglichen mit der Referenzgruppe ($(45,41 \pm 2,0) \mu\text{m}$, $p < 0,001$, $n = 3$). Zwischen den Tieren, von Tag P1 bis P6 und von Tag P1 bis Tag P 21 behandelt, gab es wiederum keinen signifikanten Unterschied der kortikalen Dicke (vgl. Abb. 3.87).

Der Anteil der Glomeruli im Rindenbereich von $58 \mu\text{m}$ lag bei von Tag P1 bis P6 behandelten Tieren bei $(35,17 \pm 0,6)\%$ und war damit signifikant erhöht gegenüber dem Anteil der Referenzgruppe, der bei $(13,45 \pm 1,1)\%$ lag ($p < 0,001$, $n = 3$). Ebenfalls signifikant war der Anteil der über drei Wochen behandelten Tiere (P1-P21) $(40,58 \pm 1,5)\%$ versus der an den ersten sechs Tagen (P1-P6) $(35,17 \pm 0,6)\%$ behandelten Tiere ($p < 0,05$, $n = 3$) (vgl. Abb. 3.88).

Die gemessenen Durchmesser wurden in einen Graphen mit den Durchmessern auf dem x-Achsenabschnitt und die relative Häufigkeit auf dem y-Achsenabschnitt aufgetragen. Hierbei zeigte sich bei Tieren, von Tag P1 bis P21 behandelt, ein Maximum der Verteilungskurve bei etwa $20 \mu\text{m}$, das Maximum der Verteilungskurve der Tiere, die nur von Tag P1 bis P6 mit SC-236 behandelt wurden lag bei etwa $30 \mu\text{m}$, wobei der Kurvenverlauf im Bereich des Maximalwertes deutlich flacher verlief, als bei den Tieren, die von Tag P1 bis P21 behandelt wurden und von $20 \mu\text{m}$ bis $30 \mu\text{m}$ reichte. Im Vergleich dazu lag das Maximum der Verteilungskurve in der Referenzgruppe bei etwa $35 \mu\text{m}$. Im Bereich von $35 \mu\text{m}$ bis $60 \mu\text{m}$ verliefen die Kurven von Tag P1 bis P6 behandelten Tieren und von Tag P1 bis P21 behandelten Tieren nahezu parallel (vgl. Abb. 3.89 bis Abb. 3.91).

3.9.1 Zusammenstellung der Ergebnisse

	Nierengewicht/ Körpergewicht [$\times 10^{-3}$]	Durchmesser [μm]	Kortikale Dicke [μm]	Anteil der Glome- ruli im Rindenbe- reich [%]
Referenzgruppe	$17,48 \pm 0,6$	$41,18 \pm 1,5$	$45,41 \pm 2,0$	$13,45 \pm 1,1$
SC-236 (P1-P6)	$12,36 \pm 0,4$	$30,43 \pm 0,5$	$21,22 \pm 0,5$	$35,17 \pm 0,6$
SC-236 (P1-P21)	$11,50 \pm 0,4$	$28,87 \pm 0,7$	$15,59 \pm 2,1$	$40,58 \pm 1,5$

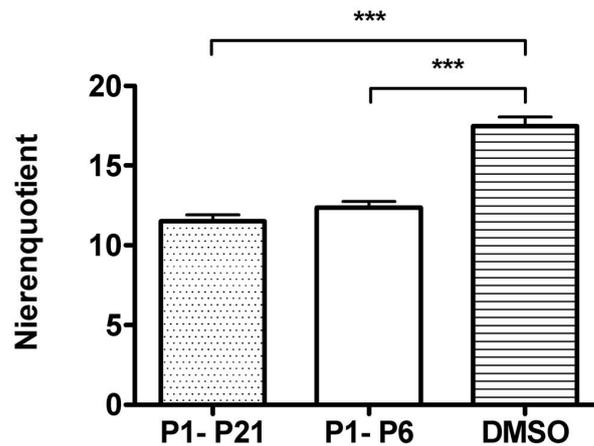


Abbildung 3.85: Nierenquotienten an Tag P21 von C57/BL6-Mäusen, behandelt mit 20 mg/kg·KG SC-236 über 21 Tage (P1-P21), behandelt mit 20 mg/kg·KG SC-236 über 6 Tage von P1 bis P6 (P1-P6) und anschließend weiter mit gleichen Volumina DMSO bis P21 und behandelt mit gleichen Volumina DMSO (DMSO) über 21 Tage. Es zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen der Referenzgruppe und SC-236 von P1 bis P21 und zwischen der Referenzgruppe und SC-236 von P1 bis P6. Kein signifikanter Unterschied zeigte sich zwischen der Gruppe, die von Tag P1 bis P21 SC-236 erhielt und der Gruppe, die Tag P1 bis P6 SC-236 erhielt. Dargestellt ist der Nierenquotient \pm SEM. (***) $p < 0,001$, $n = 3$)

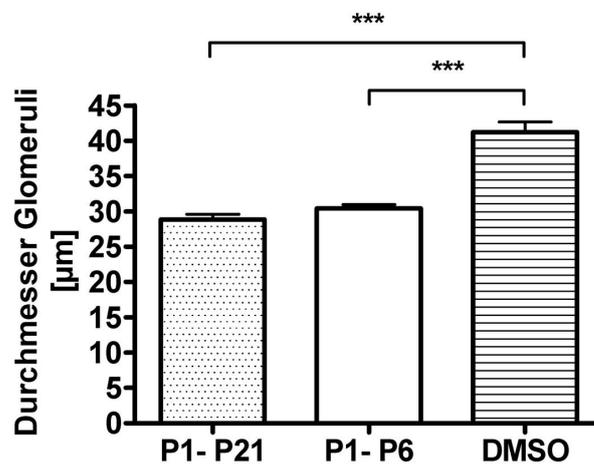


Abbildung 3.86: Die mittleren Durchmesser der Glomeruli von an Tag P21 entnommenen Nieren aus C57/BL6-Mäusen, behandelt mit 20 mg/kg·KG SC-236 über 21 Tage (P1-P21), behandelt mit 20 mg/kg·KG SC-236 über 6 Tage von P1 bis P6 (P1-P6) und anschließend weiter mit gleichen Volumina DMSO bis P21 und behandelt mit gleichen Volumina DMSO (DMSO) über 21 Tage. Es zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen der Referenzgruppe und SC-236 von Tag P1 bis P21 und zwischen der Referenzgruppe und SC-236 von Tag P1 bis P6. Kein signifikanter Unterschied zeigte sich zwischen der Gruppe, die bis Tag P21 SC-236 erhielt und der Gruppe, die bis Tag P6 SC-236 erhielt. Dargestellt sind die Durchmesser \pm SEM. (***) $p < 0,001$, $n = 3$)

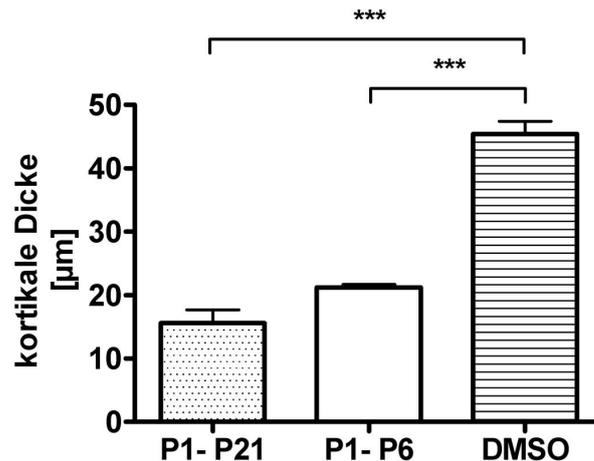


Abbildung 3.87: Die kortikale Dicke an Tag P21 von Nieren aus C57/BL6-Mäusen, behandelt mit 20 mg/kg·KG SC-236 über 21 Tage (P1-P21), behandelt mit 20 mg/kg·KG SC-236 über 6 Tage von P1 bis P6 (P1-P6) und anschließend weiter mit gleichen Volumina DMSO bis P21 und behandelt mit gleichen Volumina DMSO (DMSO) über 21 Tage. Es zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen der Referenzgruppe und SC-236 bis P21 und zwischen der Referenzgruppe und SC-236 bis P6. Kein signifikanter Unterschied zeigte sich zwischen der Gruppe, die bis Tag P21 SC-236 erhielt und der Gruppe, die bis Tag P6 SC-236 erhielt. Dargestellt sind die kortikalen Dicken \pm SEM (***) $p < 0,001$, $n = 3$)

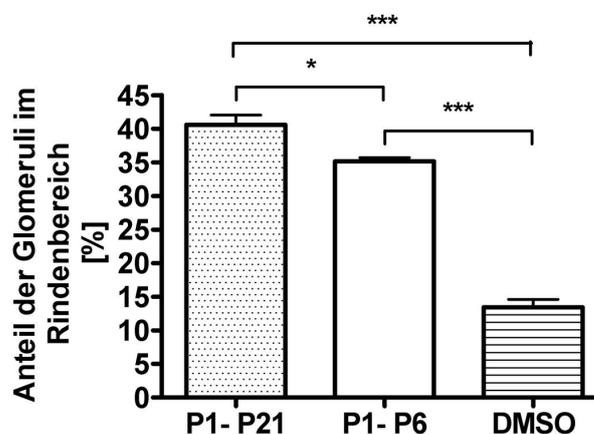


Abbildung 3.88: Darstellung der Anteile der Glomeruli im Rindbereich innerhalb 58 μm an Tag P21 von C57/BL6-Mäusen, behandelt mit 20 mg/kg·KG SC-236 über 21 Tage (P1-P21), behandelt mit 20 mg/kg·KG SC-236 über 6 Tage von P1 bis P6 (P1-P6) und anschließend weiter mit gleichen Volumina DMSO bis P21 und behandelt mit gleichen Volumina DMSO (DMSO) über 21 Tage. Es zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen der Referenzgruppe und SC-236 von Tag P1 bis P21 und zwischen der Referenzgruppe und SC-236 von Tag P1 bis P6, sowie ein signifikanter Unterschied zwischen der Gruppe, die von Tag P1 bis P21 SC-236 erhielt und der Gruppe, die von Tag P1 bis P6 SC-236 erhielt. Dargestellt ist der prozentuale Anteil der Glomeruli im Rindbereich von 58 μm \pm SEM. (* $p < 0,05$, ***) $p < 0,001$, $n = 3$)

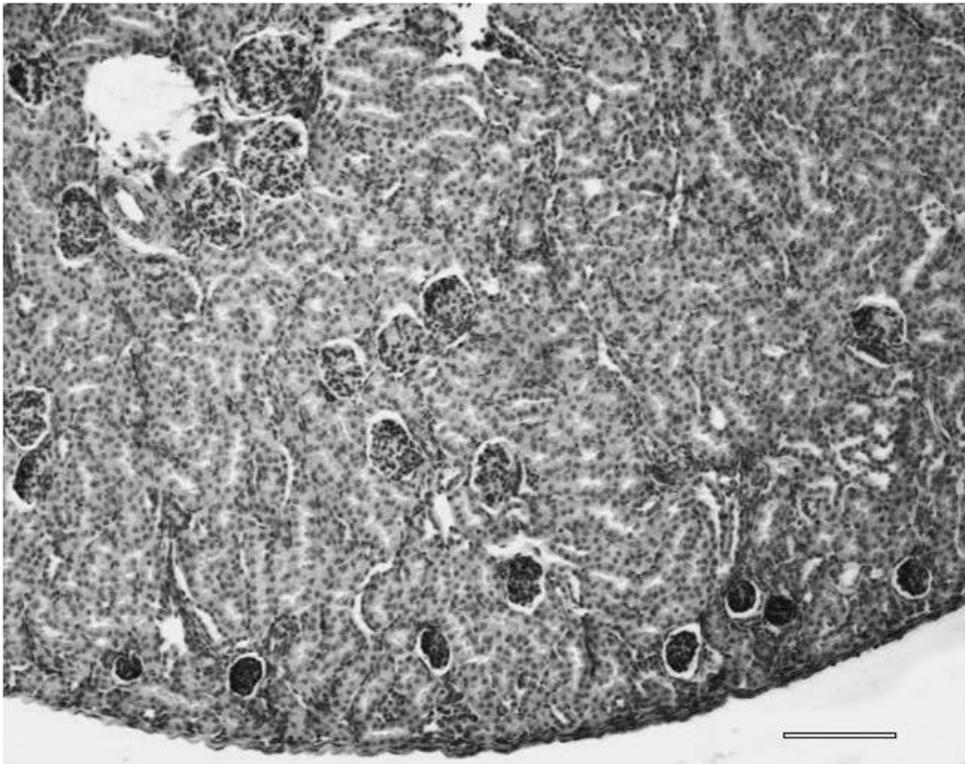


Abbildung 3.89: Ausschnitt der Niere einer C57/BL6-Maus, behandelt mit 20 mg/kg-KG SC-236 von Tag P1 bis P6 an Tag P21, Balken entspr. 100 μm , 200 x vergrößert, HE-Färbung. Zu sehen sind zu kleine dicht gelagerte Glomeruli im subkapsulären Bereich, während im inneren Kortex und Markbereich hyperplastische Glomeruli zu sehen sind.

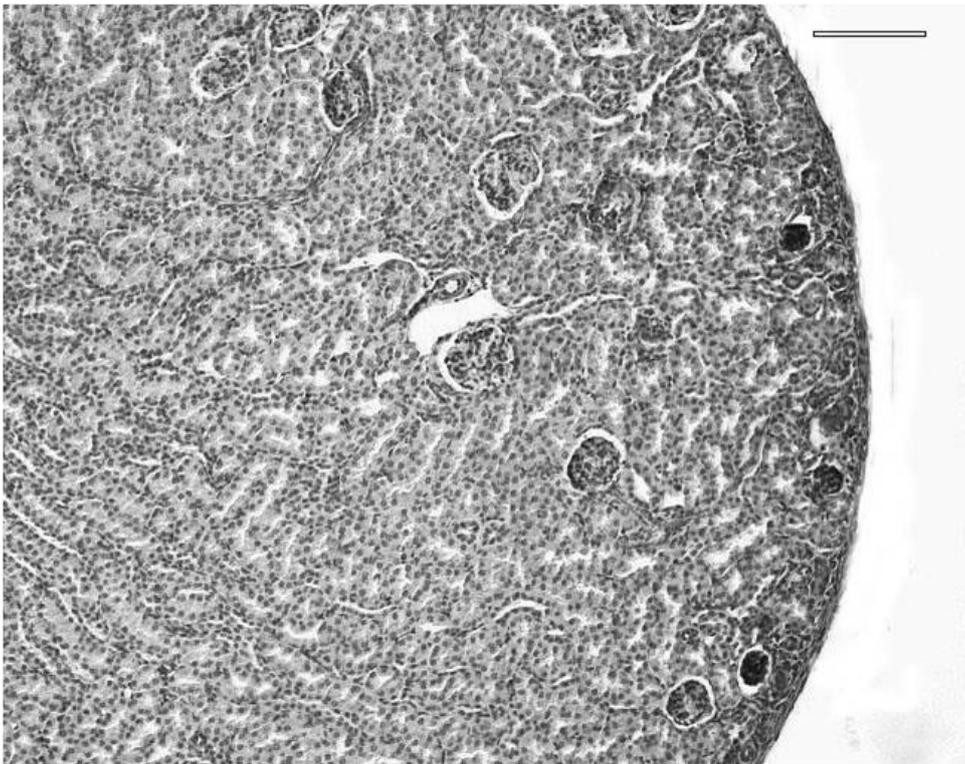


Abbildung 3.90: Ausschnitt der Niere einer C57/BL6-Maus, behandelt mit 20 mg/kg-KG SC-236 von Tag P1 bis P21 an Tag P21, Balken entspr. 100 μm , 200 x vergrößert, HE- Färbung. Wie in Abb. 3.87 sieht man zu kleine dicht unterhalb der Kapsel gelegene Glomeruli. Im inneren Kortex und Markbereich sind dagegen hyperplastische Glomeruli zu finden.

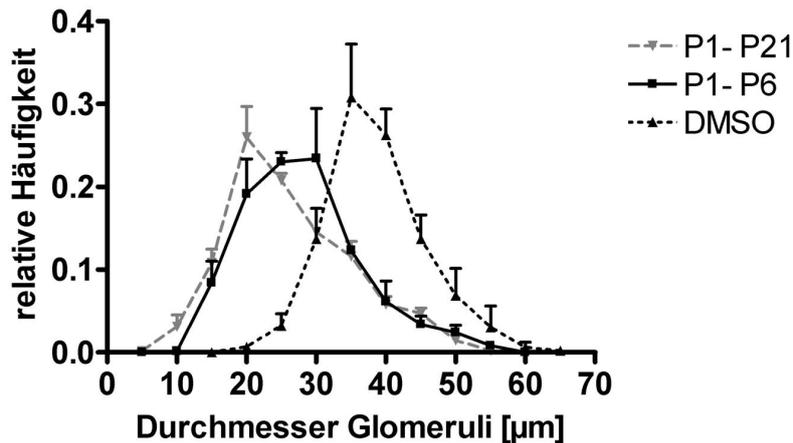


Abbildung 3.91: Verteilungskurve der relativen Häufigkeiten der Glomeruli von C57/BL6-Mäusen, behandelt mit 20 mg/kg·KG SC-236 über 21 Tage (P1-P21), behandelt mit 20 mg/kg·KG SC-236 über 6 Tage von P1 bis P6 und anschließend mit gleichen Volumina DMSO bis P21 (P1-P6) und eine Gruppe von C57/BL6 Mäusen, behandelt mit gleichen Volumina DMSO (DMSO) über 21 Tage. ($n = 3 \pm \text{SEM}$)

3.10 Inhibitoren im Renin-Angiotensin-System

Durch die enge Verknüpfung des Signalwege des RAAS und des Prostaglandinsystems war es interessant zu sehen, ob die Inhibition des RAAS eine Störung der Nephrogenese dem der COX-2^{-/-}-Maus entsprechenden Bild hervorufen kann. Die folgenden Abbildungen (vgl. Abb. 3.92 bis Abb. 3.95) zeigen die Nieren von Mäusen, die mit dem ACE-Inhibitor Enalapril und dem Angiotensin II-Rezeptor-Typ 1-Antagonisten Telmisartan behandelt wurden, sowie die Niere einer C57/BL6-Maus, die nicht behandelt wurde und die Niere einer COX-2^{-/-}-Maus an Tag P21. Zu beachten ist die verminderte Papillenausdehnung bei den mit Enalapril und Telmisartan behandelten Mäusen im Vergleich zu den unbehandelten Mäusen und den COX-2^{-/-}-Mäusen. Zunächst wurde für Enalapril und Telmisartan eine Dosierung von 1 mg/kg·KG berechnet. Bei beiden Substanzen verstarben die Tiere bereits nach einem Tag, weshalb bei beiden Substanzen in einer weiteren Versuchsreihe eine Dosierung von 0,1 mg/kg·KG gewählt wurde.

3.10.1 ACE-Hemmer: Enalapril

Enalapril wurde in einer Konzentration von 0,1 mg/kg·KG über 21 Tage verabreicht. Der Nierenquotient lag bei $13,69 \pm 0,4$ verglichen mit $17,48 \pm 0,6$ in der Gruppe der DMSO behandelten Tieren und ist damit signifikant erniedrigt ($p < 0,01$, $n = 3$). Der mittlere Durchmesser der Glomeruli lag bei der Prüfgruppe mit $(29,42 \pm 1,07) \mu\text{m}$ signifikant unter der Referenzgruppe, bei der dieser Wert $(41,18 \pm 1,5) \mu\text{m}$ betrug ($p < 0,01$, $n = 3$). Auch die kortikale Dicke in der Prüfgruppe lag deutlich unter der Referenzgruppe. Der Wert betrug bei mit Enalapril behandelten Tieren $(23,23 \pm 0,5) \mu\text{m}$

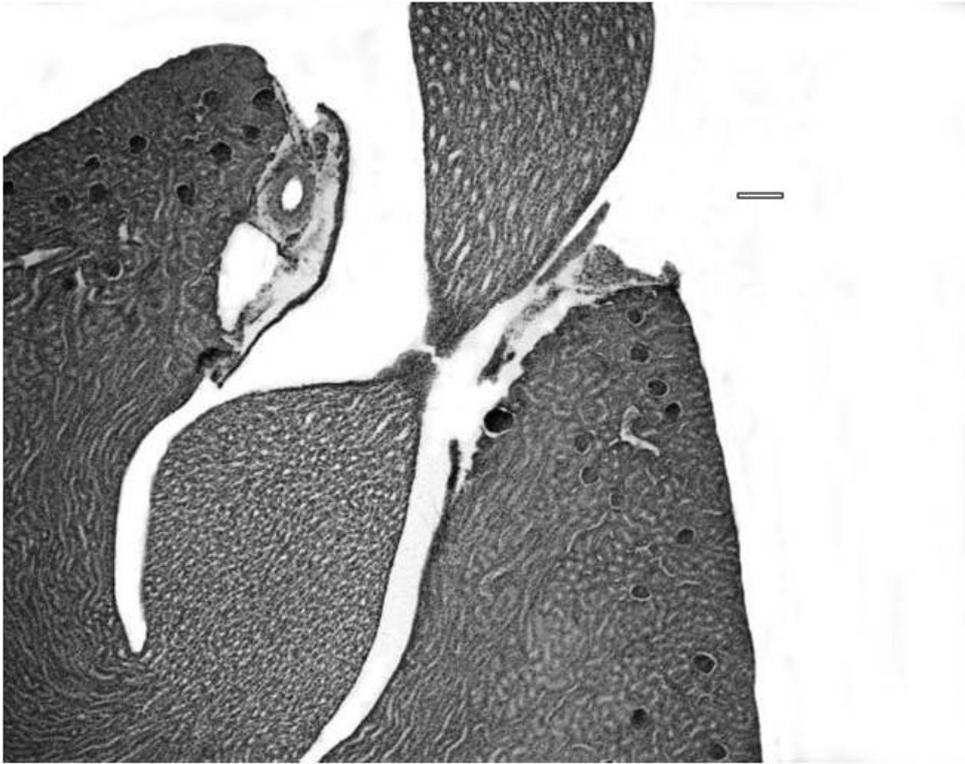


Abbildung 3.92: Ausschnitt der Niere einer C57/BL6-Maus, mit täglich 0,1 mg/kg·KG Enalapril behandelt. Man sieht hier im Vergleich mit Abb. 3.94 und 3.95, eine schmalere Papille. Balken entspr. 100 μm , 80 x vergrößert, HE-Färbung.



Abbildung 3.93: Ausschnitt der Niere an Tag P21 einer C57/BL6-Maus, mit täglich 0,1 mg/kg·KG Telmisartan behandelt. Man sieht hier im Vergleich zu Abb. 3.94 und Abb. 3.95, eine schmalere Papille. Balken entspr. 100 μm , 80 x vergrößert, HE-Färbung.

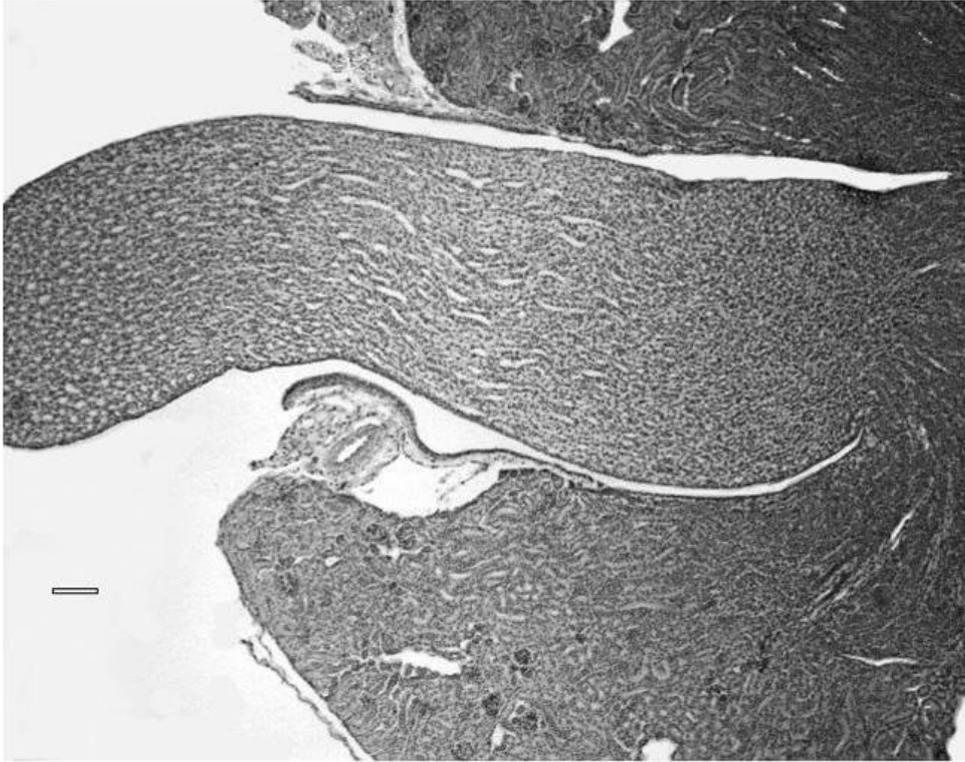


Abbildung 3.94: Ausschnitt der Niere einer C57/BL6-Maus, unbehandelt an Tag P21. Man sieht hier im Vergleich mit Abb. 3.92 und 3.93, eine breitere Papille. Balken entspr. 100 μm , 80 x vergrößert, HE-Färbung.

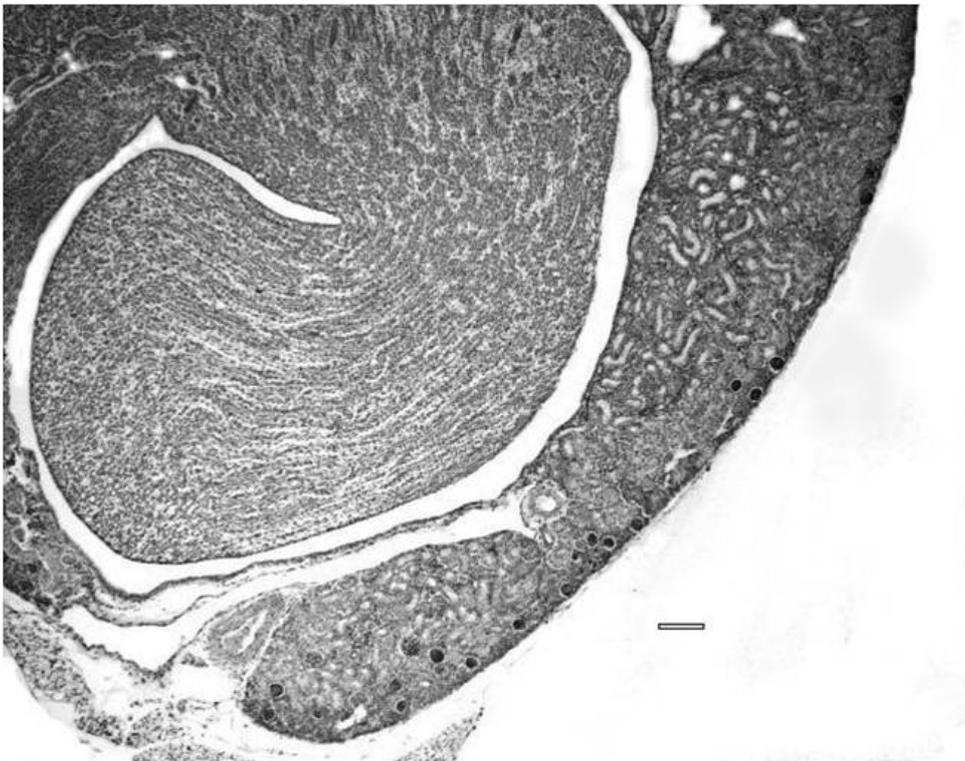


Abbildung 3.95: Ausschnitt der Niere einer COX-2^{-/-}-Maus, unbehandelt an Tag P21. Man sieht hier im Vergleich mit Abb. 3.92 und 3.93, eine breitere Papille. Balken entspr. 100 μm , 80 x vergrößert, HE-Färbung.

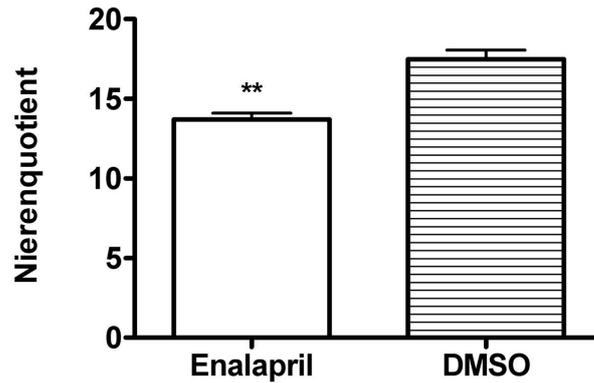


Abbildung 3.96: Nierenquotienten an Tag P21 von C57/BL6-Mäusen, behandelt mit 0,1 mg/kg·KG Enalapril und behandelt mit gleichen Volumina DMSO über 21 Tage. Es zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen beiden Gruppen. Dargestellt ist der Nierenquotient \pm SEM. (**P<0,01, n = 3)

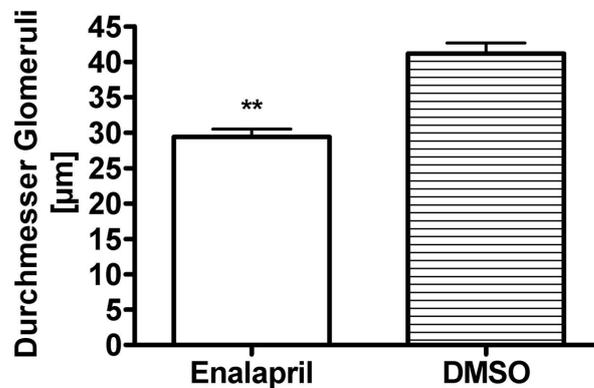


Abbildung 3.97: Die mittleren Durchmesser der Glomeruli von am postpartalen Tag P21 entnommenen Nieren aus C57/BL6-Mäusen, behandelt mit 0,1 mg/kg·KG Enalapril und behandelt mit gleichen Volumina DMSO über 21 Tage. Es zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen beiden Gruppen. Dargestellt sind die Durchmesser \pm SEM. (**p < 0,01, n = 3)

versus $(45,41 \pm 2,0) \mu\text{m}$ in der Referenzgruppe ($p < 0,001$, $n = 3$). Der Anteil der Glomeruli im Rindbereich bis $58 \mu\text{m}$ lag in der Enalapril-Gruppe bei $(18,12 \pm 0,7)\%$ im Vergleich zur Referenzgruppe, $(13,45 \pm 1,1)\%$, signifikant höher ($p < 0,05$, $n = 3$) (vgl. Abb. 3.96 - 3.100). Die gemessenen Durchmesser wurden in einen Graphen mit den Durchmessern auf dem x-Achsenabschnitt und die relative Häufigkeit auf dem y-Achsenabschnitt aufgetragen. Hierbei zeigte sich ein Maximum der Verteilungskurve bei etwa $25 \mu\text{m}$ verglichen mit etwa $35 \mu\text{m}$ in der Referenzgruppe. Die Kurve der Prüfgruppe lag verglichen mit der Kurve der COX-2^{-/-} Mäuse um weniger als $5 \mu\text{m}$ nach rechts verschoben (vgl. Abb. 3.101).

3.10.2 Angiotensin II-Rezeptor-Typ 1-Antagonist: Telmisartan

Telmisartan wurde in einer Konzentration von 0,1 mg/kg·KG über 21 Tage verabreicht. Der Nierenquotient lag bei $15,09 \pm 0,1$ im Vergleich zu $17,48 \pm 0,6$ bei den mit DMSO behandelten Mäusen

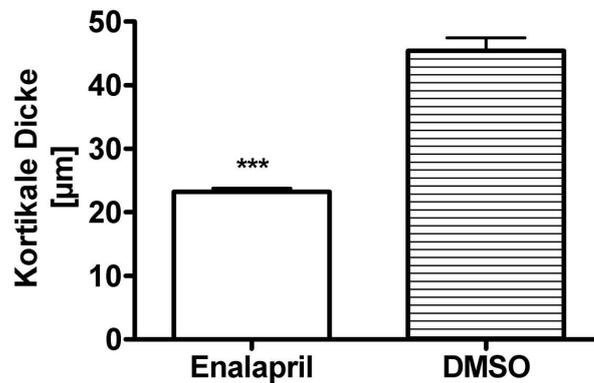


Abbildung 3.98: Die kortikale Dicke von Nieren aus C57/BL6-Mäusen, behandelt mit 0,1 mg/kg·KG Enalapril und behandelt mit gleichen Volumina DMSO über 21 Tage an Tag P21. Es zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen beiden Gruppen. Dargestellt sind die kortikalen Dicken \pm SEM. (***) $p < 0,05$, $n = 3$)

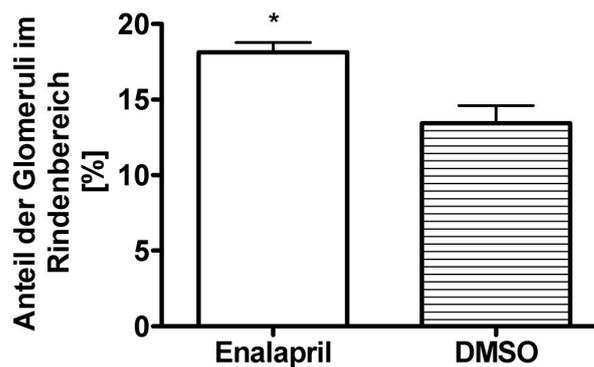


Abbildung 3.99: Darstellung der Anteile der Glomeruli im Rindbereich innerhalb 58 μm an Tag P21 von C57/BL6-Mäusen, behandelt mit 0,1 mg/kg·KG Enalapril und behandelt mit gleichen Volumina DMSO über 21 Tage. Es zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen beiden Gruppen. Dargestellt ist der prozentuale Anteil der Glomeruli im Rindbereich von 58 μm \pm SEM. (* $p < 0,05$, $n = 3$)

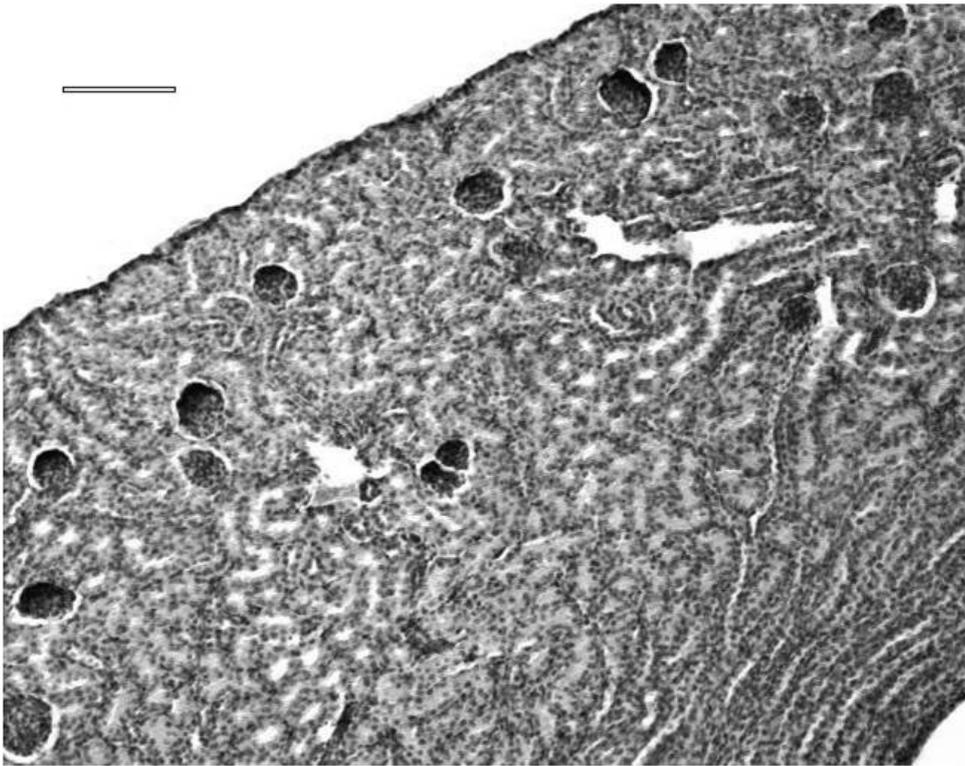


Abbildung 3.100: Ausschnitt der Niere einer C57/BL6-Maus, behandelt mit 0,1 mg/kg·KG Enalapril über 21 Tage an Tag P21, Balken entspr. 100 μ m, 200 x vergrößert, HE-Färbung. Zu sehen sind kleine Glomeruli, die teilweise subkapsulär liegen.

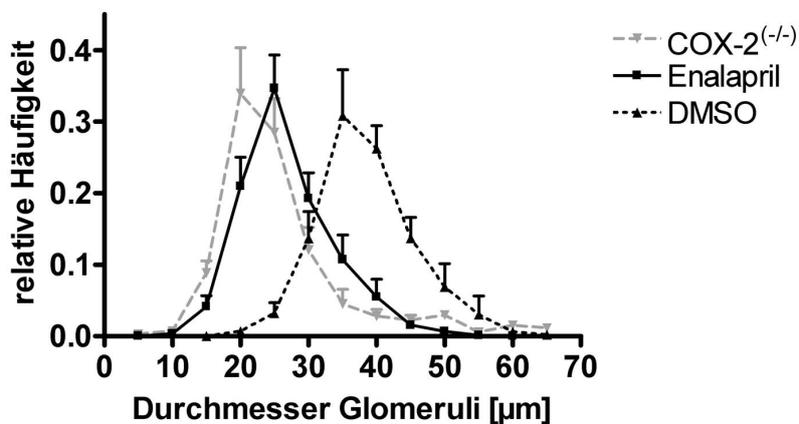


Abbildung 3.101: Verteilungskurve der relativen Häufigkeiten der Glomeruli \pm SEM von COX-2^(-/-)-Mäusen, C57/BL6-Mäusen, behandelt mit 0,1 mg/kg·KG Enalapril und behandelt mit gleichen Volumina DMSO über 21 Tage.

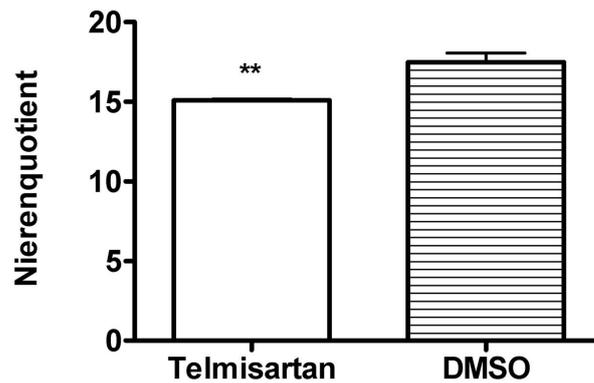


Abbildung 3.102: Nierenquotienten an Tag P21 von C57/BL6-Mäusen, behandelt mit 0,1 mg/kg·KG Telmisartan und behandelt mit gleichen Volumina DMSO über 21 Tage. Es zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen beiden Gruppen. Dargestellt ist der Nierenquotient \pm SEM. (** $p < 0,01$, $n = 3$)

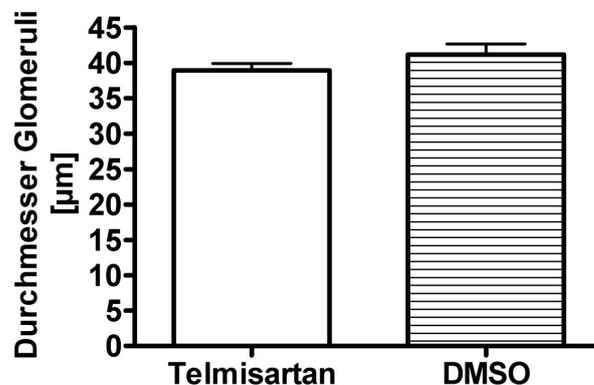


Abbildung 3.103: Die mittleren Durchmesser der Glomeruli von an Tag P21 entnommenen Nieren aus C57/BL6-Mäusen, behandelt mit 0,1 mg/kg·KG Telmisartan und behandelt mit gleichen Volumina DMSO über 21 Tage. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen beiden Gruppen. Dargestellt sind die Durchmesser \pm SEM. ($p > 0,05$, $n = 3$)

($p < 0,01$, $n = 3$). Der mittlere Durchmesser der Glomeruli betrug in der Prüfgruppe ($38,93 \pm 1$) μm versus ($41,18 \pm 1,5$) μm in der Referenzgruppe ($p = 0,275$, $n = 3$). Die kortikale Dicke betrug bei den mit Telmisartan behandelten Tieren ($47,57 \pm 2,4$) μm versus ($45,41 \pm 2,0$) μm in der Referenzgruppe ($p = 0,529$, $n = 3$). Der mittlere Durchmesser der Glomeruli und die kortikale Dicke sind nicht signifikant erniedrigt im Vergleich zur Referenzgruppe. Der Anteil der Glomeruli im Rindenbereich von $58 \mu\text{m}$ betrug ($4,78 \pm 1,7$)% versus ($13,45 \pm 1,1$)% in der Referenzgruppe ($p < 0,05$, $n = 3$) (vgl. Abb. 3.102 - 3.106). Die Verteilungskurve verlief nahezu parallel zur Referenzgruppe, die ein Maximum bei etwa $35 \mu\text{m}$ hatte, allerdings zeigte sich bei den mit Telmisartan behandelten Tieren ein Plateau von $30 \mu\text{m}$ bis $40 \mu\text{m}$, während die Kurve der Referenzgruppe spitz verlief (vgl. Abb. 3.107).

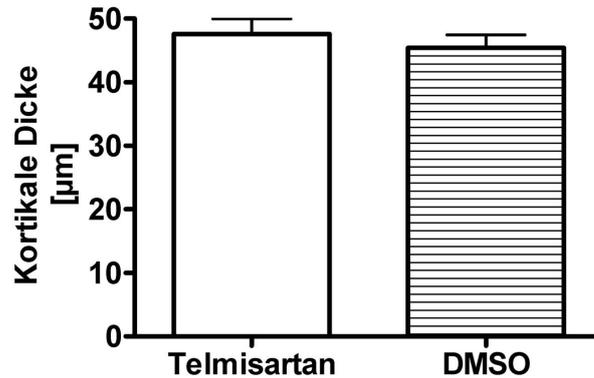


Abbildung 3.104: Die kortikale Dicke von Nieren aus C57/BL6-Mäusen, behandelt mit 0,1 mg/kg·KG Telmisartan und behandelt mit gleichen Volumina DMSO über 21 Tage an Tag P21. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen beiden Gruppen. Dargestellt sind die kortikalen Dicken \pm SEM. ($p > 0,05$, $n = 3$)

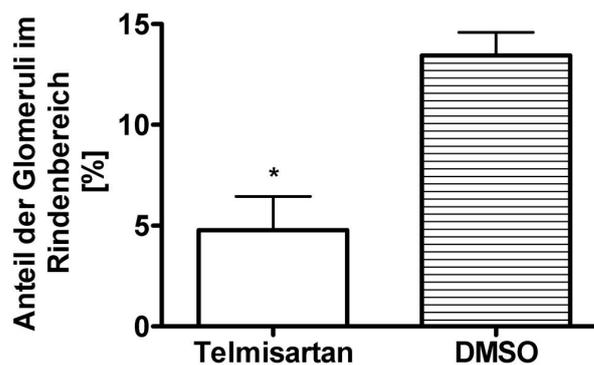


Abbildung 3.105: Darstellung der Anteile der Glomeruli im Rindenbereich innerhalb 58 μm von C57/BL6-Mäusen, behandelt mit 0,1 mg/kg·KG Telmisartan und behandelt mit gleichen Volumina DMSO über 21 Tage an Tag P21. Es zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen beiden Gruppen. Dargestellt ist der prozentuale Anteil der Glomeruli im Rindenbereich von 58 μm \pm SEM. ($*p < 0,05$, $n = 3$)

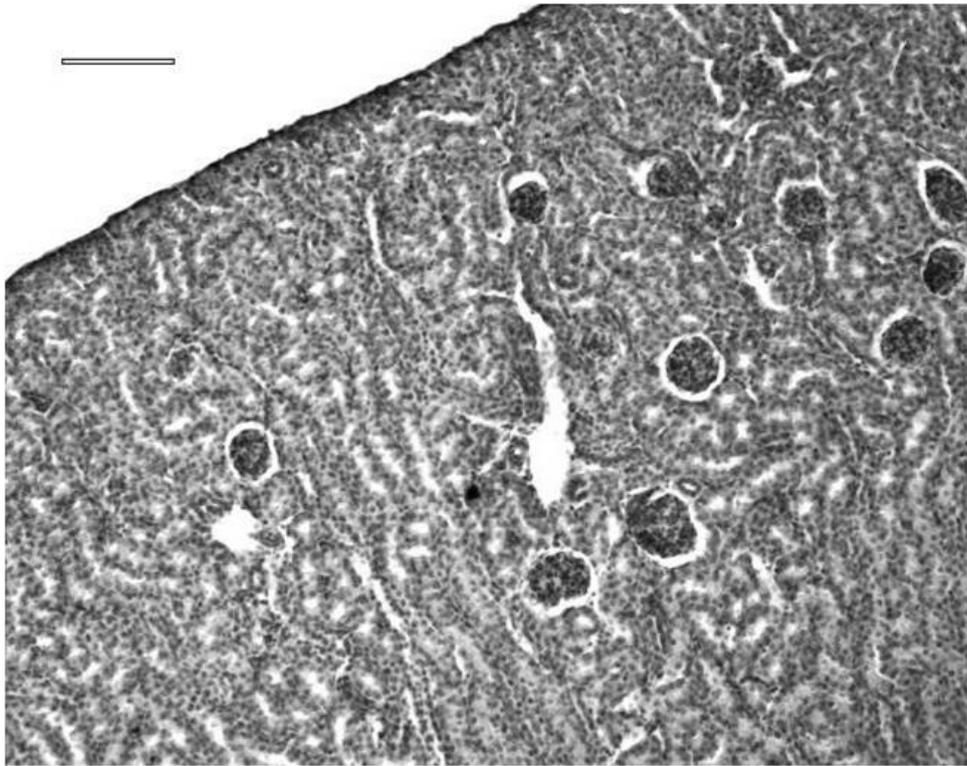


Abbildung 3.106: Ausschnitt der Niere einer C57/BL6-Maus, behandelt mit 0,1 mg/kg·KG Telmisartan über 21 Tage an Tag P21, Balken entspr. 100 μm , 200 x vergrößert, HE-Färbung. Zu sehen sind nur teilweise subkapsulär gelegene kleine Glomeruli, während die Glomeruli im inneren Kortex und Markbereich eine normale Größe zeigen.

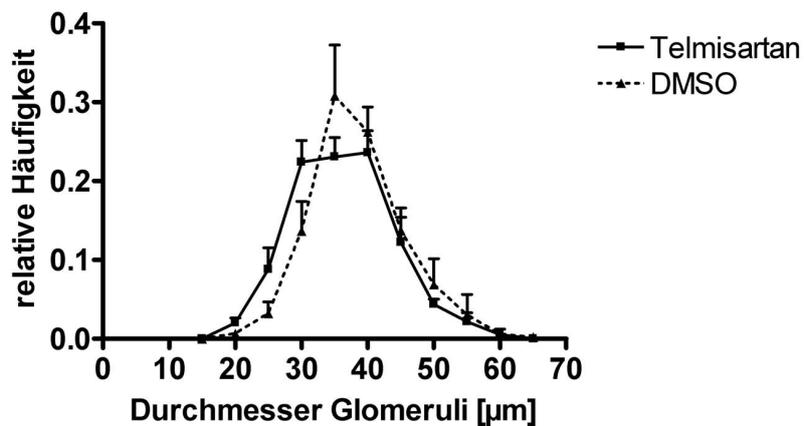


Abbildung 3.107: Verteilungskurve der relativen Häufigkeiten der Glomeruli \pm SEM von C57/BL6-Mäusen, behandelt mit 0,1 mg/kg·KG Telmisartan und behandelt mit gleichen Volumina DMSO über 21 Tage an Tag P21.

3.10.3 Zusammenstellung der Ergebnisse

	Nierengewicht/ Körpergewicht [x 10 ⁻³]	Durchmesser [μm]	Kortikale Dicke [μm]	Anteil der Glome- ruli im Rindenbe- reich [%]
Referenzgruppe	17,48 \pm 0,6	41,18 \pm 1,5	45,41 \pm 2,0	13,45 \pm 1,1
Enalapril	13,69 \pm 0,4	29,42 \pm 1,1	23,23 \pm 0,5	18,12 \pm 0,7
Telmisartan	15,09 \pm 0,1	38,93 \pm 1,0	47,57 \pm 2,4	4,78 \pm 1,7

3.11 Inhibitoren im Akt-/GSK-Signalweg

Bei beiden hier verwendeten Substanzen, der Akt-Inhibitor Triciribine und ein GSK-3 β -Inhibitor, verstarben in der ursprünglichen Dosierung von 1 mg/kg·KG die Mäuse in den ersten Lebenstagen, weshalb eine weitere Versuchsreihe mit einer Dosis 0,25 mg/kg·KG durchgeführt wurde.

3.11.1 GSK-3 β -Inhibitor

Der Nierenquotient an Tag P21 betrug 13,82 \pm 0,2 im Vergleich zu 17,48 \pm 0,6 in der Referenzgruppe und war signifikant geringer ($p < 0,01$, $n = 3$). Der mittlere Durchmesser lag in der mit GSK-Inhibitor behandelten Gruppe bei (28,81 \pm 0,6) μm versus (41,18 \pm 1,5) μm in der Referenzgruppe ($p < 0,01$, $n = 3$). Die kortikale Dicke war mit (28,78 \pm 2,8) μm signifikant dünner als die kortikale Dicke der Referenzgruppe, deren Wert (45,41 \pm 2,0) μm betrug. Der Anteil der Glomeruli im Rindbereich von 58 μm lag bei (22,32 \pm 2,8)% im Gegensatz zu (13,45 \pm 1,1)% in der Referenzgruppe ($p < 0,05$, $n = 3$) (vgl. Abb. 3.108 - 3.112).

Die Verteilungskurve der Glomeruli der mit GSK-Inhibitor behandelten Tiere war parallel zur Kurve der Referenzgruppe um etwa 10 μm nach links auf dem x-Achsenabschnitt verschoben, das Maximum liegt somit bei etwa 25 μm versus 35 μm in der Referenzgruppe (vgl. Abb. 3.113).

3.11.2 Akt-Inhibitor: Triciribine

Der Nierenquotient lag bei 14,58 \pm 0,5 im Vergleich zu 17,48 \pm 0,6 bei den mit DMSO behandelten Mäusen ($p < 0,01$, $n = 3$). Der mittlere Durchmesser der Glomeruli betrug in der Prüfgruppe 32,77 \pm 0,4 μm im Vergleich zu (41,18 \pm 1,48) μm in der Referenzgruppe ($p < 0,01$, $n = 3$) und war

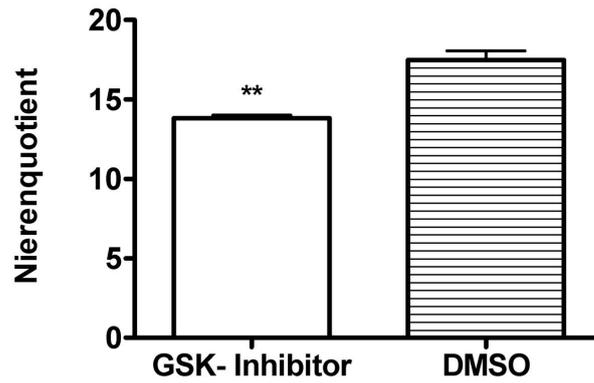


Abbildung 3.108: Nierenquotienten an Tag P21 von C57/BL6-Mäusen, behandelt mit 0,25 mg/kg·KG GSK-3 β -Inhibitor (GSK-Inhibitor) und behandelt mit gleichen Volumina DMSO über 21 Tage. Es zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen beiden Gruppen. Dargestellt ist der Nierenquotient \pm SEM. (**p < 0,01, n = 3)

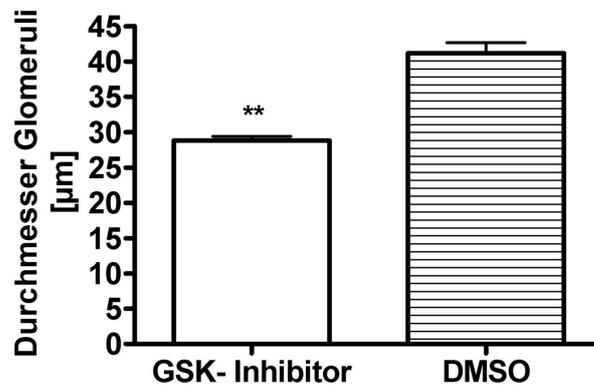


Abbildung 3.109: Die mittleren Durchmesser der Glomeruli von an Tag P21 entnommenen Nieren aus C57/BL6-Mäusen, behandelt mit 0,25 mg/kg·KG GSK-3 β -Inhibitor (GSK-Inhibitor) und behandelt mit gleichen Volumina DMSO über 21 Tage. Es zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen beiden Gruppen. Dargestellt sind die Durchmesser \pm SEM. (**p < 0,01, n = 3)

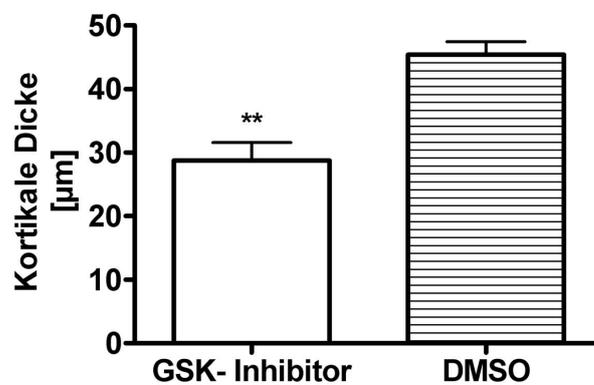


Abbildung 3.110: Die kortikale Dicke von Nieren aus C57/BL6-Mäusen, behandelt mit 0,25 mg/kg·KG GSK-3 β -Inhibitor (GSK-Inhibitor) und behandelt mit gleichen Volumina DMSO über 21 Tage an Tag P21. Es zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen beiden Gruppen. Dargestellt sind die kortikalen Dicken \pm SEM. (**p < 0,01, n = 3)



Abbildung 3.111: Darstellung der Anteile der Glomeruli im Rindenbereich innerhalb $58 \mu\text{m}$ an Tag P21 von C57/BL6-Mäusen, behandelt mit $0,25 \text{ mg/kg}\cdot\text{KG}$ GSK- 3β -Inhibitor (GSK-Inhibitor) und behandelt mit gleichen Volumina DMSO über 21 Tage. Es zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen beiden Gruppen. Dargestellt ist der prozentuale Anteil der Glomeruli im Rindenbereich von $58 \mu\text{m} \pm \text{SEM}$. (* $p < 0,05$, $n = 3$)

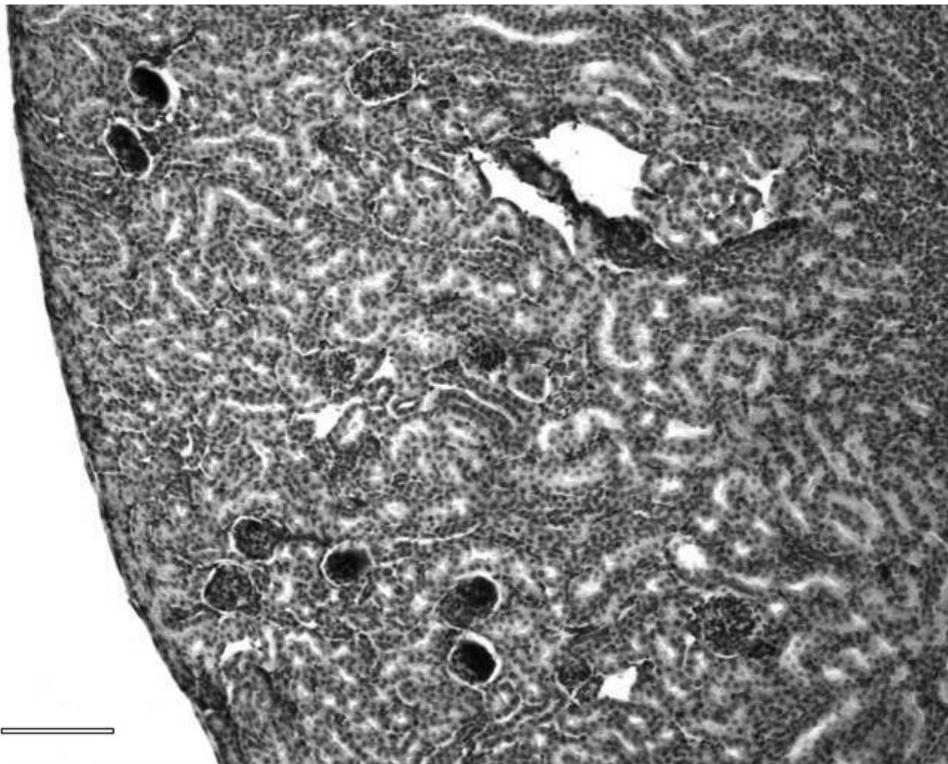


Abbildung 3.112: Ausschnitt der Niere einer C57/BL6-Maus, behandelt mit $0,25 \text{ mg/kg}\cdot\text{KG}$ GSK- 3β -Inhibitor über 21 Tage an Tag P21, Balken entspr. $100 \mu\text{m}$, $200 \times$ vergrößert, HE-Färbung. Man sieht verglichen mit Abb. 3.6 zu kleine Glomeruli vor allem im subkapsulären Bereich, während die Glomeruli im inneren Kortex und Markbereich normal groß sind.

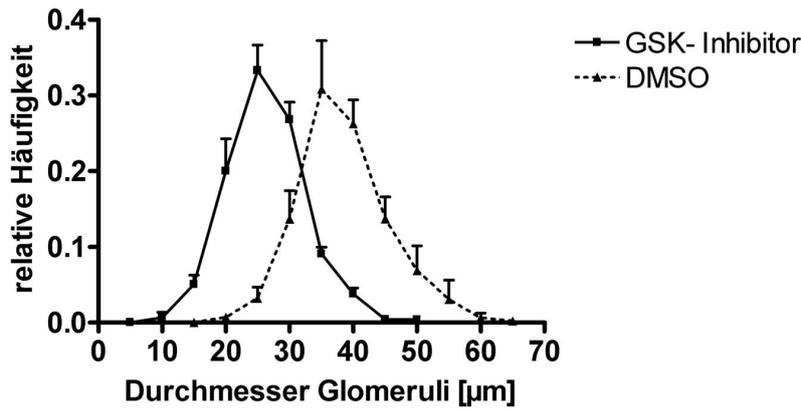


Abbildung 3.113: Verteilungskurve der relativen Häufigkeiten der Glomeruli \pm SEM von C57/BL6-Mäusen, behandelt mit 0,25 mg/kg-KG GSK-3 β -Inhibitor (GSK-Inhibitor) und behandelt mit gleichen Volumina DMSO über 21 Tage an Tag P21.

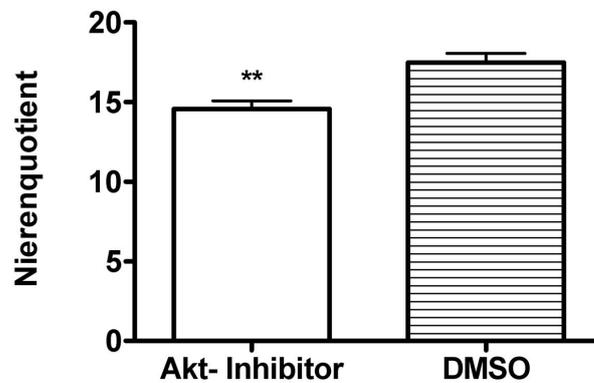


Abbildung 3.114: Nierenquotienten an Tag P21, berechnet aus Nierengewicht/Körpergewicht \times 1000 von C57/BL6-Mäusen, behandelt mit 0,25 mg/kg-KG Triciribine (Akt-Inhibitor) und behandelt mit gleichen Volumina DMSO über 21 Tage. Es zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen beiden Gruppen. Dargestellt ist der Nierenquotient \pm SEM. (**p < 0,01, n = 3)

somit signifikant geringer als in der Referenzgruppe. Die kortikale Dicke betrug bei den mit Triciribine behandelten Tieren $(42,27 \pm 4,2) \mu\text{m}$ versus $(45,41 \pm 2,0) \mu\text{m}$ in der Referenzgruppe und war nicht signifikant dünner ($p = 0,542$, $n = 3$). Der Anteil der Glomeruli im Rindbereich von $58 \mu\text{m}$ betrug $(14,21 \pm 2,5)\%$ versus $(13,45 \pm 1,1)\%$ in der Referenzgruppe und war ebenfalls nicht signifikant verändert ($p = 0,792$, $n = 3$) (vgl. Abb. 3.114 - 3.118). Die Verteilungskurve der Durchmesser der Glomeruli hatte ihr Maximum bei etwa $30 \mu\text{m}$ versus etwa $35 \mu\text{m}$ in der Referenzgruppe (vgl. Abb. 3.119).

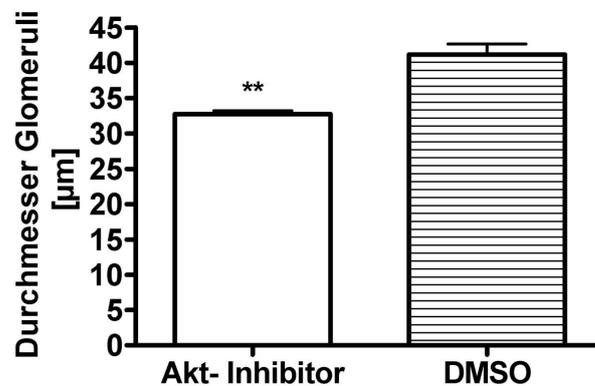


Abbildung 3.115: Die mittleren Durchmesser der Glomeruli von an Tag P21 entnommenen Nieren aus C57/BL6-Mäusen, behandelt mit 0,25 mg/kg-KG Triciribine (Akt-Inhibitor) und behandelt mit gleichen Volumina DMSO über 21 Tage. Es zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen beiden Gruppen. Dargestellt sind die Durchmesser \pm SEM. (** $p < 0,01$, $n = 3$)

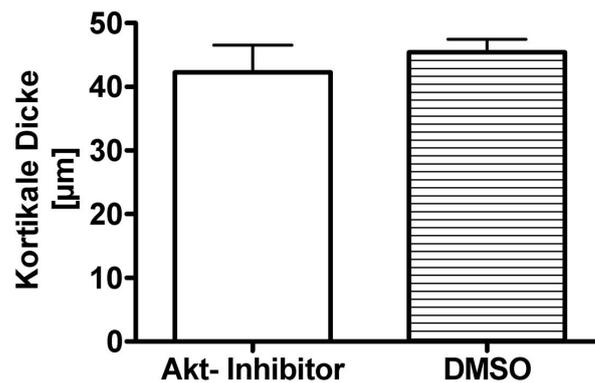


Abbildung 3.116: Die kortikale Dicke von Nieren aus C57/BL6-Mäusen, behandelt mit 0,25 mg/kg-KG Triciribine (Akt-Inhibitor) und behandelt mit gleichen Volumina DMSO über 21 Tage an Tag P21. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen beiden Gruppen. Dargestellt sind die kortikalen Dicken \pm SEM. ($p > 0,05$, $n = 3$)

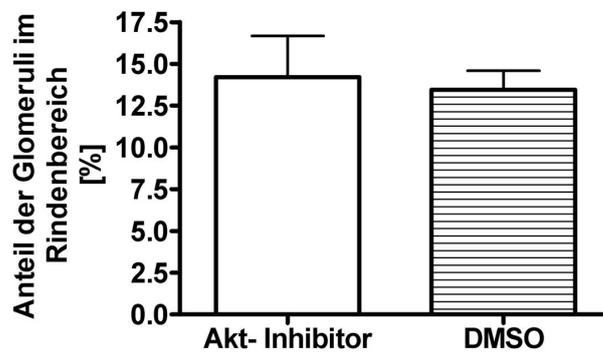


Abbildung 3.117: Darstellung der Anteile der Glomeruli im Rindbereich innerhalb $58 \mu\text{m}$ von C57/BL6-Mäusen, behandelt mit $0,25 \text{ mg/kg}\cdot\text{KG}$ Triciribine (Akt-Inhibitor) und behandelt mit gleichen Volumina DMSO über 21 Tage an Tag P21. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen beiden Gruppen. Dargestellt ist der prozentuale Anteil der Glomeruli im Rindbereich von $58 \mu\text{m} \pm \text{SEM}$. ($p > 0,05$, $n = 3$)

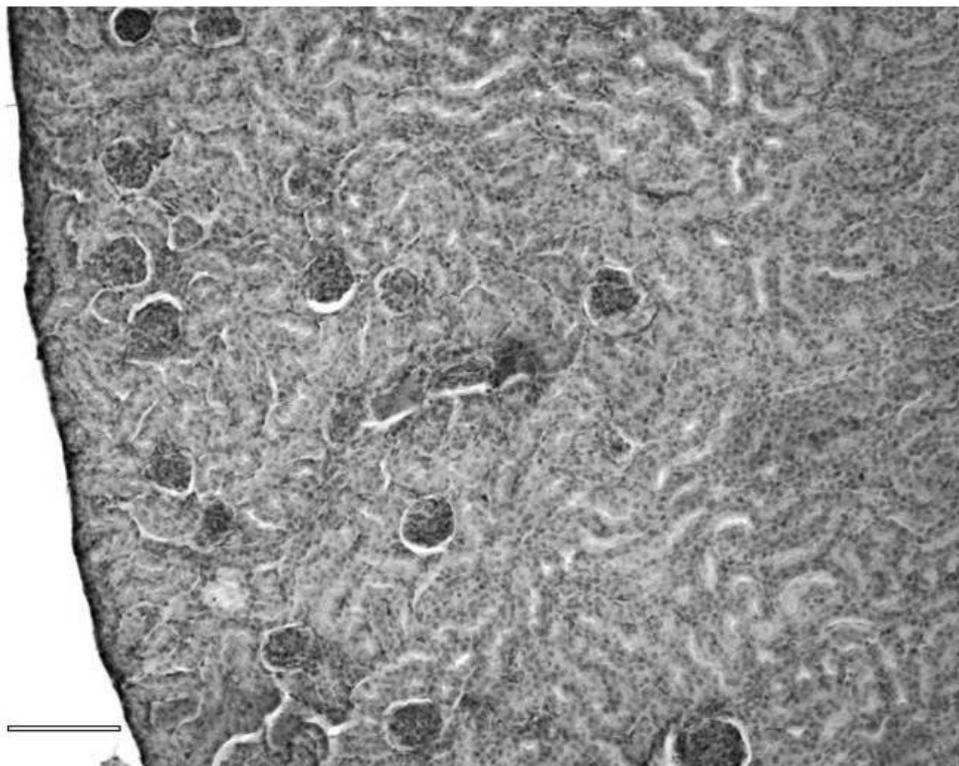


Abbildung 3.118: Ausschnitt der Niere einer C57/BL6-Maus, behandelt mit $0,25 \text{ mg/kg}\cdot\text{KG}$ Akt-Inhibitor Triciribine über 21 Tage an Tag P21, Balken entspr. $100 \mu\text{m}$, $200 \times$ vergrößert, HE-Färbung. Man sieht zu kleine Glomeruli im subkapsulären Bereich.

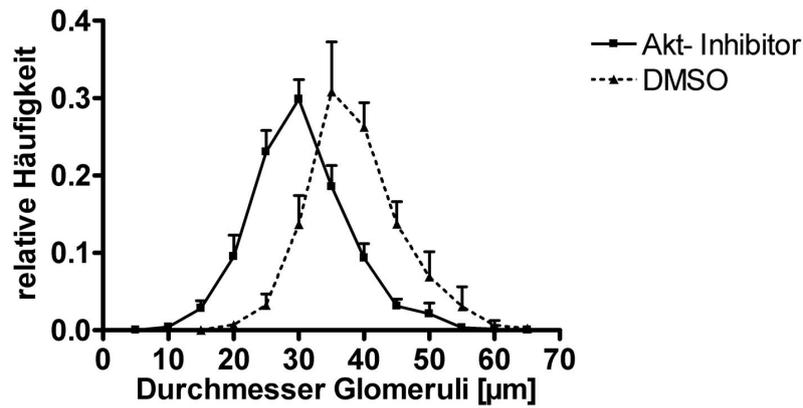


Abbildung 3.119: Verteilungskurve der relativen Häufigkeiten der Glomeruli \pm SEM von C57/BL6-Mäusen, behandelt mit 0,25 mg/kg·KG Triciribine (Akt-Inhibitor) und behandelt mit gleichen Volumina DMSO über 21 Tage an Tag P21.

3.11.3 Zusammenstellung der Ergebnisse

	Nierengewicht/ Körpergewicht [$\times 10^{-3}$]	Durchmesser [μm]	Kortikale Dicke [μm]	Anteil der Glome- ruli im Rindenbe- reich [%]
Referenzgruppe	$17,48 \pm 0,6$	$41,18 \pm 1,5$	$45,41 \pm 2,0$	$13,45 \pm 1,1$
GSK-Inhibitor	$13,82 \pm 0,2$	$28,81 \pm 0,6$	$28,78 \pm 2,8$	$22,32 \pm 2,8$
Triciribine	$14,58 \pm 0,5$	$32,77 \pm 0,4$	$42,27 \pm 4,2$	$14,21 \pm 2,5$

Kapitel 4

Diskussion

4.1 Cyclooxygenasen und die Niere

4.1.1 Die Wirkung von COX-2-Inhibitoren auf die Nephrogenese

Aus den Studien an COX-1- und COX-2-Knockout-Mäusen lernen wir, dass gerade im späten Abschnitt der Nephrogenese die COX-2 eine wichtige Rolle spielt. Im Gegensatz zu den COX-1^{-/-}-Mäusen, die keine Pathologien der Nieren aufweisen, sind die Nieren von COX-2^{-/-}-Mäusen makroskopisch blass und klein, der Quotient aus Nierengewicht zu Körpergewicht ist reduziert und mikroskopisch stellen sich subkapsulär gelegene zu kleine, dicht gedrängte Glomeruli dar. Der Kortex ist hypoplastisch und teilweise zystisch verändert. Glomeruli außerhalb dieses Bereiches sind eher hyperplastisch [71]-[73].

In unseren Versuchen wurden alle Substanzen in DMSO gelöst, alle Tiere erhielten die gleichen Volumina an DMSO und wurden von Tag P1 bis Tag P7 s.c. zwischen die Schulterblätter injiziert und von Tag P8 bis Tag P21 i.p., um für alle Versuche einheitliche Bedingungen zu schaffen.

Die Dosierung der klinisch verwendeten Coxibe und klassischen NSAIDs richtete sich nach den Dosierungen bei Menschen und wurden etwa mit einem Faktor 10 multipliziert, da Mäuse einen schnelleren Stoffwechsel aufweisen. Die Dosis von Naproxen wurde von etwa 150 mg/kg·KG auf 50 mg/kg·KG reduziert, da die LD50 bei Mäusen für Naproxen nur 360 mg/kg·KG beträgt [181]. Diese Dosierung liegt jedoch immer noch etwa um den Faktor 3 über der humanen Tageshöchstdosis. Der selektive experimentelle COX-2-Inhibitor SC-791 wurde in der gleichen Konzentration wie SC-236 und SC-560 eingesetzt. SC-791 zeigte jedoch in allen erhobenen Parametern, trotz einer stärkeren Hemmung der COX-2 (IC₅₀ = 4 nM (SC-791) gegenüber IC₅₀ = 10 nM von SC-236) einen nicht so stark ausgeprägten Effekt, verglichen mit SC-236.

Die erstmals von Dinchuck *et al.* beobachteten Veränderungen an den Nieren [71] konnten auch an COX-2^{-/-}-Mäusen unserer Zucht beobachtet werden. Von Interesse war, ob die Hemmung der COX-2

während der Nephrogenese durch die aktuell oder in der Vergangenheit unterschiedlichen klinisch eingesetzten Coxibe zu einem ähnlichen Bild führt und ob sich die Coxibe in ihrer Wirkung auf die Nephrogenese unterscheiden würden. Des Weiteren wurden in dieser Studie klassische nicht selektive NSAIDs eingesetzt, bei denen untersucht wurde, ob sie ein dem selektiven experimentellen COX-2-Inhibitor SC-236 und den COX-2^{-/-}-Mäusen histologisch ähnlichen Phänotyp der Niere zeigen.

Für den selektiven experimentellen COX-2-Inhibitor SC-236 konnten Kömhoff *et al.* zeigen, dass es zur Veränderung des Phänotypes der Niere, ähnlich den Veränderungen an der Niere der COX-2^{-/-}-Maus, kam, wohingegen eine Behandlung mit dem selektiven experimentellen COX-1-Inhibitor SC-560 keinen Einfluss auf die Nephrogenese zeigte [128]. Bei unseren Untersuchungen zeigte sich bei den COX-2^{-/-}-Mäusen ein um ca. 44% reduzierter Durchmesser der Glomeruli im Vergleich zur Referenzgruppe. Bei den mit SC-236 behandelten Mäusen zeigte sich hier eine Reduktion um 32% verglichen mit der Referenzgruppe, damit stimmen die Ergebnisse nicht komplett überein mit denen von Kömhoff *et al.*, die bei beiden Gruppen eine Reduktion des Durchmesser der Glomeruli um 39% feststellten. Bei den Absolutwerten kommt der Durchmesser der Glomeruli der mit SC-236 behandelten Tiere dem von Kömhoff *et al.* [128] erhobenen Wert am nächsten ((28,87 ± 0,7) μm vs. (29,35 ± 0,4) μm). Ursachen für die Abweichungen könnten in der unterschiedlichen Applikationsart oder den unterschiedlichen Applikationszeiträumen liegen. Kömhoff *et al.* [128] behandelten die Muttertiere über die Tränke und damit indirekt die Welpen, bzw. Feten. Eine Veränderung der Nephrogenese nach Gabe von SC-236 in einer Dosierung von 0,6 mg/L in Wasser mit 0,1% Tween und 0,2% Polyethylenglykol über die Tränke wie es von Kömhoff *et al.* [128] beschrieben wurde, konnten in unserer Arbeitsgruppe nicht reproduziert werden [182], [183].

Bei den mit SC-560 behandelten Tieren konnten wir ebenfalls keine signifikanten Veränderungen der Messwerte der Nephrogenese feststellen, übereinstimmend zu den Beobachtungen an COX1^{-/-}-Mäusen und den von Kömhoff *et al.* gemachten Beobachtungen [128], der C57/BL6-Mäusen SC-560 in einer Dosis von 3 mg/L über die Tränke verabreichte. Die Coxibe und die beiden hier verwendeten NSAIDs, Naproxen und Diclofenac, sowie SC-791 zeigten bei den Mäusen reduzierte Nierenquotienten, allerdings nicht signifikant für die beiden Substanzen Celecoxib und Valdecoxib. Des Weiteren zeigten alle Tiere, die mit den Coxiben und den klassischen NSAIDs, Diclofenac und Naproxen, sowie dem experimentellen Inhibitor SC-791 behandelt wurden, signifikant reduzierte mittlere Durchmesser der Glomeruli. Dabei war überraschend, dass der Effekt der beiden klassischen NSAIDs im Trend einen gleichen oder sogar größeren Effekt zeigte, als der einiger Coxibe und SC-791. Naproxen reduzierte beispielsweise den Durchmesser der Glomeruli um etwa 32%, was vergleichbar mit der Reduktion durch SC-236 über 21 Tage war. Die übrigen Substanzen reduzierten den Durchmesser um 25 bis 30% (Diclofenac, Etoricoxib, Lumiracoxib, Rofecoxib, SC-791) bzw. 18 bis 20% (Celecoxib, Valdecoxib) der Referenzgruppe (DMSO). Hier zeigte sich bei einem Gruppenvergleich mittels ANOVA und

Bonferroni-Korrektur kein Unterschied zwischen den Prüfsubstanzen aus dem klinischen Bereich.

Die Reduktion der kortikalen Dicke zeigte sich im Vergleich zu den Durchmessern der Glomeruli als weniger homogen. Die Nieren der Tiere, die mit SC-236 behandelt wurden, zeigten hierbei die stärkste Reduktion um etwa 66%. Um 30 bis 40% war die kortikale Dicke bei den Nieren von Tieren, die mit SC-791, Etoricoxib, Rofecoxib und Diclofenac behandelt wurden, reduziert. Bei den Nieren, Lumiracoxib, Valdecoxib und Naproxen behandelte Tiere war die kortikale Dicke um 20 bis 30% und um 12% bei Tieren, die mit Celecoxib behandelt wurden. Außer bei Celecoxib war die kortikale Dicke verglichen mit der Referenzgruppe im t-Test signifikant reduziert. Abgesehen von Celecoxib zeigte sich im Gruppenvergleich eine signifikante Reduktion der kortikalen Dicke verglichen zur Referenzgruppe, zusätzlich zeigte sich auch ein signifikanter Unterschied zwischen Celecoxib und Etoricoxib. Im Vergleich dazu war bei COX-2^{-/-}-Mäusen die kortikale Dicke um ca. 77% reduziert.

Der Anteil der Glomeruli im Rindenbereich war bei den mit Celecoxib behandelten Tieren ebenfalls nicht signifikant erhöht (13,19%). Bei den übrigen Coxiben, den klassischen NSAIDs, Diclofenac und Naproxen, sowie SC-791 lagen die Anteile der Glomeruli im Rindenbereich von 18 bis 30% verglichen mit 13,45% in der Referenzgruppe und 68,51% in der Gruppe der COX-2^{-/-}-Mäuse, auch hier war der Effekt von SC-236 mit 40,58% wieder deutlich stärker ausgeprägt als bei den übrigen Substanzen.

In dieser Studie ging es nicht um die Toxizität der unterschiedlichen Substanzen, weshalb keine Daten zur Letalität der Mauswelpen erhoben wurden. Auffallen war jedoch eine erhöhte Anzahl an verstorbenen Mauswelpen bei den mit SC-236 behandelten Tieren im Vergleich zu denen, die mit den Coxiben, den klassischen NSAIDs, Diclofenac und Naproxen, sowie SC-791 behandelt wurden. Die Substanz SC-236 scheint besonders potent die COX-2 zu hemmen, was durch die stärkste Wirkung auf die Störung der Nephrogenese bestätigt wird. SC-236 imitiert am meisten den Phänotyp der COX-2^{-/-}-Maus. Bei der Entwicklung der Coxibe, v.a. von Celecoxib wurde für die Substanz SC-236, die dem Celecoxib sehr ähnlich ist, eine „inakzeptabel lange Halbwertszeit“ (HWZ) festgestellt, zudem entstanden in vivo Pyrazol-Analoga, die potentiell metabolisch wirksam erschienen, weshalb ein klinischer Einsatz für SC-236 nicht weiter verfolgt wurde [184]. Folglich findet sich in der langen HWZ eine Erklärung für die starken Wirkungen dieser Substanz. Eine weitere Erklärung der starken Effekte von SC-236 könnten neben der COX-2-Inhibition möglicherweise weitere Effekte auf den COX-2 und den Prostaglandin-Stoffwechsel durch beispielweise oben erwähnte wirksame Metaboliten sein. Möglich sind ebenfalls Einflüsse von SC-236 auf weitere Signalwege, da für SC-236 beispielsweise beschrieben wurde, dass es die Angiogenesefaktoren „*vascular endothelium growth factor*“ (VEGF) und „*basic fibroblast growth factor*“ (bFGF) supprimiert [185] und dadurch Entwicklung und Wachstum der Nierengefäße stören kann. Hierzu könnten weitere Untersuchungen mit speziellen Färbungen zur Darstellung der Gefäße Klarheit verschaffen. Ebenso könnten weitere Versuchreihen in ähnlichem Studiendesign mit Inhibitoren der Angiogenesefaktoren im Vergleich zu SC-236 den Zusammenhang

dieser Nebeneffekte untersuchen.

Warum der Effekt von Celecoxib nicht sehr stark ausgeprägt war, bleibt letztendlich unbeantwortet. Mögliche Ursachen sind evtl. ein erhöhter Metabolismus von Celecoxib bei Mäusen, weshalb nur niedrige Serum-Spiegel erreicht werden. Allerdings wurde in dieser Studie Celecoxib in einer Konzentration von 100 mg/kg·KG eingesetzt, was der 10-fachen Tageshöchstdosis von Menschen entspricht. Hierbei würden weitere Untersuchungen mit der Bestimmung von Serum-Spiegeln Antworten finden. Die Schwierigkeit hieran ist, dass über den Zeitraum des Wachstums und der Entwicklung der Mauswelpen vor allem in den ersten Lebenstagen aufgrund der Körpergröße Serumproben nur Final und in kleinen Mengen gewonnen werden können. Die Untersuchungen haben jedoch gezeigt, dass die Hemmung der COX-2 vor allem an den ersten Lebenstagen eine Störung der Nephrogenese hervorruft. Eine weitere Erklärung könnte die Tatsache sein, dass die Tagesgesamtdosis an Celecoxib bei Menschen in zwei Einzeldosen verabreicht wird, da es eine geringere HWZ (8 bis 11 h), als beispielsweise Etoricoxib (HWZ = 20 bis 30 h) und Rofecoxib (HWZ = ca. 17 h), sowie Naproxen (HWZ = 12 bis 15 h) hat. Möglicherweise gibt es über die kürzere HWZ des Celecoxibs für den weniger starken Effekt eine einfache Erklärung. Die Hemmpotenz für die COX-2 ist bei Celecoxib unter den Coxiben am schwächsten ausgeprägt. Unterstützt könnte diese Vermutung durch den ebenfalls nicht so stark ausgeprägten Effekt des Valdecoxibs werden, das ebenfalls eine HWZ von 8 bis 11 h aufweist. Allerdings wird damit der Effekt des NSAID Diclofenac nicht erklärt, da dessen HWZ bei Menschen im Bereich von nur etwa 2 h liegt. Hier könnte ein langsamer Metabolismus des Diclofenac bei der Maus als Ursache der relativ stark ausgeprägten Wirkung auf die Nephrogenese vorliegen. Die LD50 der Maus liegt für Diclofenac bei 140-390 mg/kg·KG [181] und wurde in der 10-fachen Dosis des Menschen verabreicht.

Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass neben dem selektiven experimentellen COX-1-Inhibitor SC-560, das Derivat des Celecoxibs DMC, welches keine COX-2 Inhibition verursacht [186], keine Effekte auf die erhobenen Parameter hat, was unterstreicht, dass es sich am ehesten um einen COX-2 abhängigen Effekt auf die Nephrogenese handelt. In unserer Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass die beschriebenen Veränderungen während der Nephrogenese wahrscheinlich über einen Mangel an PGE2 ausgelöst werden. Über die Gabe von EP2- und EP4-Agonisten konnten die Schäden an den Nieren der COX-2^{-/-}-Mäuse teilweise behoben werden [183]. Ebenfalls konnte in unserer Arbeitsgruppe gezeigt werden, dass die Blockade des EP4-Rezeptors einer EP2^{-/-}-Maus, die keine renalen Auffälligkeiten zeigt [187], dem histologischen Phänotyp einer COX-2^{-/-}-Maus entsprach [183]. Aufgrund dieser Ergebnisse wird angenommen, dass der Mechanismus der COX-2 abhängigen Nephrogenese über den EP4-Rezeptor, möglicherweise auch teilweise über den EP2-Rezeptor vermittelt wird.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass es sich hier wahrscheinlich um einen Gruppeneffekt der klassischen NSAIDs und Coxibe auf die COX-2 abhängige Nephrogenese handelt. Die gestörte Nephrogenese wird vermutlich durch eine verminderte Bildung von PGE2 über die Hemmung der COX-2 verursacht.

4.1.2 Kinetik der COX-2-Expression– Reversibilität der COX-2-Inhibition?

Bei den TaqMan-Analysen und den Western Blot-Analysen konnte eine Zunahme der COX-2-Expression an den postnatalen Tagen P2 bis P8 beobachtet werden, was sich mit den Daten von Kömhoff *et al.* deckt [128]. Bei den TaqMan-Analysen zeigte sich ein signifikanter Anstieg der relativen Expression von COX-2-mRNA nur an Tag P4 und ein leichter, nicht signifikanter Anstieg an Tag P6, während im Westernblot an den Tagen P4, P6 und P8 der COX-2-Proteingehalt jeweils erhöht war. Allerdings zeigte sich nur an Tag P6 ein signifikant erhöhter Wert, was mit einer leichten Verzögerung auf der Proteinebene erklärt werden kann. In der zu Grunde liegenden Studie wurden für die Westernblot-Analysen Gesamtmembranproteinfraktionen verwendet, während Kömhoff *et al.* Mikrosomen verwendeten, was allerdings keine Unterschiede im relativen COX-2-Proteingehalt ausmachen dürfte.

Nun stellte sich die Frage, ob eine COX-2-Inhibition an den Tagen der höchsten Expression, bei Mäusen also zwischen Tag P2 und P6, vergleichbare Veränderungen an der Niere verursacht und ob diese Schäden irreversibel sind. In dieser Studie konnte beobachtet werden, dass die Gabe von SC-236 von Tag P1 bis P6 an Tag P21 die typischen, oben genannten morphologischen Veränderungen an der Niere zeigt. Diese Veränderungen decken sich mit denen, die Kömhoff *et al.* für eine Behandlung über mindestens 21 Tage beschrieben haben. Es zeigten sich zwischen der Gruppe, die von Tag P1 bis P21 mit 20 mg/kg·KG SC-236 behandelt wurden keine signifikanten Unterschiede bei den Nierenquotienten, den Durchmesser der Glomeruli und der kortikalen Dicke, zu denen die nur von Tag P1 bis P6 20 mg/kg·KG SC-236 erhielten. Daraus lässt sich schließen, dass eine vorübergehende Behandlung mit SC-236 in den ersten Lebensstagen der Maus die Störung der Nephrogenese induziert und diese irreversibel ist.

Lediglich der Anteil der Glomeruli im Rindenbereich von 58 μ m war bei den Tieren, die von Tag P1 bis P6 behandelt wurden signifikant gesunken von 40,58% bei Tieren, die durchgehend von Tag P1 bis P21 mit 20 mg/kg·KG SC-236 behandelt wurden, auf 35,17%. Weitere Untersuchungen zu diesem Sachverhalt werden in unserer Arbeitsgruppe durchgeführt. Sinnvoll wäre sicherlich eine Einzelgabe von SC-236 oder vergleichbaren selektiven COX-2-Inhibitoren an den Tagen mit hoher COX-2-Expression und die anschließende histomorphometrische Betrachtung an Tag P21.

4.2 RAAS-Inhibition: Enalapril und Telmisartan

Bekannt war bereits aus einigen Studien, dass die Gabe von Inhibitoren des RAAS in der Fetalzeit Auswirkungen auf die Nephrogenese hat und in dieser Zeit die Renin-Expression erhöht ist [149]. Der Phänotyp von Mäusen, die entweder mit einem Inhibitor des RAAS behandelt wurden oder die für einen Teil des RAAS defizient sind, zeigen insbesondere eine Atrophie der Papille, hyperplastische

glatte Muskelzellen, als Mediahypertrophie gekennzeichnet, dilatierte und atrophische Tubuli und eine verzögerte Reifung der Glomeruli ([139] u.a.). Diese Veränderungen nachzuvollziehen waren bei dieser Studie nicht vorrangiges Ziel. Jedoch konnten Untersuchungen mittels Lichtmikroskopie ohne weitere Objektivierung zumindest die Veränderungen an der Papille zeigen.

Bei Menschen ist diese Substanzgruppe während der gesamten Schwangerschaft kontraindiziert, da unter der Behandlung mit AT1-Rezeptor-Antagonisten und ACE-Inhibitoren vermehrt Oligohydramnia, sowie postnatales Nierenversagen, Hyperkaliämie und Hypotonie, fetale Wachstumsretardierung, pulmonale Hypoplasie, Fehlbildungen der Extremitäten und der knöchernen Kalotte aufgetreten sind [188], [189].

Da bei erwachsenen Tieren und Menschen bei der Regulation des RBF und des Na⁺- und Wasserhaushaltes das RAAS und der Prostaglandinstoffwechsel stark miteinander verknüpft sind, war von Interesse, wie sich die RAAS-Inhibition auf die von uns definierten Parameter bezüglich der Nierenentwicklung verhalten würde. Die Dosis von Enalapril und Telmisartan richtete sich wie bei den NSAIDs nach der Dosis im klinischen Einsatz bei erwachsenen Menschen. Ebenso erfolgte die Applikation der beiden Substanzen auf die gleiche Weise (s.c. zwischen die Schulterblätter an den Tagen P1-P6 und i.p. von Tag P7-P21). Hierbei bestand nun die erste große Schwierigkeit in der Dosisfindung. Nach Gabe von Enalapril und Telmisartan in einer Dosierung von 1 mg/kg·KG verstarben bereits an Tag P2/P3 alle Mauswelpen, weshalb die Dosis bei einer zweiten Versuchsreihe auf 0,1 mg/kg·KG reduziert wurde. Bei erwachsenen Menschen liegt die Standarddosierung von Enalapril bei ca. 0,3 mg/kg·KG und die von Telmisartan bei ca. 0,5 bis 1,0 mg/kg·KG. Somit lag zumindest die Dosierung von Telmisartan deutlich unter der Standarddosierung bei Menschen in der Therapie der arteriellen Hypertonie [190]. Bei adulten Mäusen wurde über eine Dosierung von täglich 0,1 mg/kg·KG bis zu 10 mg/kg·KG Telmisartan berichtet [191]. Möglicherweise wurde die Durchblutung der nicht fertig entwickelten Nieren durch die hohe Dosis von Enalapril und Telmisartan in hohem Maße gestört, dass es zum Tod der Welpen an Tag P2/P3 kam.

4.2.1 ACE-Inhibitor: Enalapril

In dieser Studie konnte für die Substanz Enalapril eine signifikante Reduktion des Nierenquotienten, des mittleren glomerulären Durchmessers und der kortikalen Dicke festgestellt werden, sowie einen signifikant erhöhten Anteil an Glomeruli im Rindenbereich. Damit waren alle von uns definierten Parameter der COX-2 abhängigen Nephrogenese signifikant verändert. Zusätzlich konnten wir an den mit Enalapril behandelten Mäusen die Atrophie der Papille beobachten, allerdings trat diese bei den COX-2 Mäusen nicht auf. Dieses Ergebnis könnte nun bedeuten, dass die Nephrogenese durch eine Behandlung mit Enalapril ähnlich beeinträchtigt wird, wie bei einer Inhibition der COX-2. Eine

mögliche Schnittstelle des COX-Systems und des RAAS könnten die PGE₂-Rezeptoren sein. Bei adulten Nieren wurde nachgewiesen, dass bei COX-2-Inhibition der Reninspiegel sinkt [60]-[65]. Die hier gesehenen Effekte auf die Nephrogenese könnten durch eine gegenseitige direkte Beeinflussung der COX-2-Expression durch Enalapril entstehen. Im Widerspruch dazu haben einige Studien gezeigt, dass nach RAAS-Inhibition bei adulten Tieren die COX-2-Expression ansteigt [58], [59] und dass nach ACE-Inhibition Bradykinin ansteigt, was wiederum die COX-2-Expression zu erhöhen scheint [192]. Diese Tatsachen sind widersprüchlich zu der Annahme, dass die COX-2-Expression direkt durch Enalapril vermindert wird.

Es besteht ebenfalls die Möglichkeit, dass bei nicht vollständig entwickelten Nieren durch den Mangel an AT II, die renale Durchblutung in hohem Maße verschlechtert wird. Des Weiteren die COX-2-Expression durch die erhöhte Renin-Ausschüttung [57] zwar erhöht ist, im Sinne eines negativen Feedbacks, aber es durch den verminderten Blutfluss durch weitere Mechanismen zur allgemeinen Wachstumsretardierung kommt, wie es beispielsweise auch in den Studien von Silver *et al.* in den Nieren nach UPI beobachtet wurde [113]. Möglicherweise handelt es sich folglich nicht um einen direkten COX-2 abhängigen Mechanismus, obwohl die Daten bei einem ersten Blick dafür sprächen. Dies könnte auch erklären, warum vor allem in der Histologie der Nierenschnitte ein differentes Bild vgl. mit den COX-2^{-/-}-Mäusen zu sehen ist. Der Gesamteindruck der Nierenhistologie (3.96) ist, dass nicht wie bei der Niere der COX-2^{-/-}-Mäuse, auf der einen Seite kleine plumpe Glomeruli direkt unterhalb der Kapsel und im Rindenbereich und auf der anderen Seite große hyperplastische Glomeruli im Markbereich lagen, sondern regelmäßig verteilt zu kleine Glomeruli vorlagen. Nagata *et al.* berichten, dass bei AT1-defizienten Mäusen das Wachstum der Glomeruli verzögert ist [139]. Eine Erklärung unserer Beobachtungen an Mausnieren, die bis Tag P21 mit Enalapril behandelt wurden, wäre, dass wir den in unserem Protokoll festgelegten Tag P21 für diese Betrachtung zu früh gewählt haben und die gesehenen Veränderungen möglicherweise reversibel sind. Da AT II ein Wachstumsfaktor zu sein scheint [150], wäre der Mangel an AT II eine gute Erklärung. Auffällig an unseren Beobachtungen zeigte sich auch, dass die kortikale Dicke stärker reduziert war, als die glomerulären Durchmesser. Der Anteil der Glomeruli im Rindenbereich war dahingegen nur leicht erhöht. Bei den Nieren von Mäusen, die mit COX-Inhibitoren behandelt wurden, war es in der Regel so, dass eine stark reduzierte kortikale Dicke zu einem hohen Anteil an Glomeruli im Rindenbereich führte. Bei den mit Enalapril behandelten Tieren scheint die Anteil der Glomeruli verringert zu sein, da die kortikale Dicke um fast 50% reduziert ist, aber der Anteil der Glomeruli im Rindenbereich von 58 m nur 5% über der Referenzgruppe liegt. An der Verteilungskurve der Durchmesser der Glomeruli (3.97) sieht man die deutliche Verschiebung hin zu der Verteilungskurve der COX-2^{-/-}-Mäuse. Aber auch hier fällt auf, dass im Bereich der hohen Glomerulidurchmesser der Kurvenverlauf deutlich flacher wird, was bedeutet, dass keine oder nur wenige stark hyperplastische Glomeruli vorhanden sind. Eine Erklärung dafür könnte

sein, dass der Effekt nicht so stark ausgeprägt ist, weil die Hemmung der COX-2 ein direkter Effekt ist und die Hemmung des ACE nur indirekt die COX-2-Expression oder die COX-2-Wirkung auf die Nephrogenese verändert und somit keine Kompensation durch die marknahen Glomeruli nötig ist und diese in der Folge nicht hypertrophieren.

Auch könnte durch die Inhibition des RAAS ein genereller Effekt auf das Gleichgewicht der Wachstumsfaktoren vorliegen. Die Inhibition des RAAS verursacht einen verminderten IGF-1-Spiegel, was seinerseits über den PI3K-Weg die Akt aktiviert und damit die Transkription von NF κ B und u.a. der COX-2 [150]. Außerdem war in den dilatierten Tubuli Angiotensinogen-defizienter Mäuse mit PDGF-A ein weiterer Wachstumsfaktor vermindert [142]. Chen *et al.* konnten ebenfalls zeigen, dass einige Bestandteile des Zytoskeletts wie E-Cadherin, Syndecan und Integrin in Ratten, die mit Inhibitoren des RAAS behandelt wurden, vermindert sind. Zumindest E-Cadherin könnte über β -Catenin und den Tcf/Lef-Signalweg eine Bedeutung auf die COX-2-Expression haben [150].

Weitere Studien sollten die genannte Möglichkeit der Wachstumsverzögerung der Glomeruli klären, indem eine weitere Versuchsreihe mit Enalapril mit einer Behandlungszeit über 21 d bis beispielsweise Tag P50 fortgeführt wird und die histomorphometrischen Daten von Tag P50 erhoben und mit unbehandelten Tieren und COX-2^{-/-}-Mäusen an diesem Tag verglichen werden. Des Weiteren sollte die Expression der COX-2-mRNA oder der Gehalt an COX-2-Protein, die Prostaglandin- und Reninspiegel bei einer weiteren Versuchsreihe mit Enalapril gemessen werden, um hier die These, dass die ACE-Inhibition die COX-2-Expression in der sich entwickelnden Niere entweder senkt oder erhöht zu überprüfen. Auch sollte man nach ACE-Inhibition die Expression weiterer Wachstumshormone, wie beispielsweise EGF und weiterer Zytokine, die über einen GPCR den ERK1/2-Signalweg aktivieren, der erstens die PLA2 induziert, welche wiederum eine wichtige Rolle im AA-Stoffwechsel spielt, und der zweitens auch für Zellwachstum und Differenzierung verantwortlich ist, überprüfen.

4.2.2 AT1-Antagonist: Telmisartan

Schwerpunkt dieser Arbeit war die Untersuchung der COX-2 abhängigen Nephrogenese. Aufgrund der Tatsache, dass sich die genannten renalen Veränderungen der AT1^{-/-}-Maus mit denen von Renin-, ACE- und Angiotensinogen-defizienten Mäusen deckten [141]-[143] haben wir in dieser Arbeit einen ACE-Inhibitor und einen AT1-Rezeptor-Antagonisten gewählt. Die Ergebnisse der Versuche mit dem AT1-Antagonist Telmisartan sehen im Vergleich zu den Versuchen mit Enalapril völlig anders aus. Der Nierenquotient ist zwar signifikant reduziert, allerdings ist weder der mittlere Durchmesser, noch die mittlere kortikale Dicke signifikant reduziert. Der Anteil der Glomeruli im Rindenbereich ist sogar signifikant niedriger als in der Referenzgruppe.

Eine mögliche Erklärung bietet das in Kapitel 4.2 diskutierte Dosis-Problem. Möglicherweise reichte

die Dosis von Telmisartan nicht aus, die Nephrogenese nachhaltig zu stören, was allerdings nicht die erniedrigte Anzahl der Glomeruli im Rindbereich erklären kann.

Eine andere Möglichkeit zur Erklärung dieser Differenz zwischen dem ACE-Inhibitor Enalapril und dem AT1-Inhibitor Telmisartan könnte sein, dass die Vorgänge bei der Nephrogenese über den AT2-Rezeptor reguliert werden. Der AT2-Rezeptor wurde bisher in der fetalen Niere nur in undifferenziertem Mesenchym gefunden [133], [134]. Der AT2-Rezeptor ist der Gegenspieler des AT1-Rezeptor, der an der Regulation von Wachstum und Differenzierung beteiligt ist und reguliert die gezielte Apoptose. Eine Blockade verändert folglich die Bildung der Tubuli durch Störung des Verhältnisses von Wachstum und Apoptose [193].

Zhang *et al.* konnten zeigen, dass $AT2^{-/-}$ -Mäuse an Tag P21 in der Macula densa eine verminderte COX-2-Expression vorwiesen [57]. Hier könnte sich wiederum eine Schnittstelle des RAAS zur COX-2-Expression finden. Untersuchungen zur COX-2 abhängigen Nephrogenese mit der Blockade des AT2-Rezeptors sollten diesen Untersuchungen folgen. Des weiteren sollte versucht werden, beide Rezeptoren parallel zu blockieren, was aufgrund der Hämodynamik wahrscheinlich nicht einfach zu realisieren sein wird.

Des weiteren sind zusätzliche Untersuchungen mit weiteren AT1-Inhibitoren, mit Telmisartan in höherer Konzentration, sowie weitere Versuchsreihen mit anderen Inhibitoren des RAAS sinnvoll.

4.3 Klinische Konsequenzen aus der Studie

Die Ergebnisse dieser Untersuchungen unterstreichen, dass COX-Inhibitoren, nicht selektive und für COX-2 selektive, nicht oder nur unter gründlicher Risiko-Nutzen-Abwägung bei Schwangeren in der Spätschwangerschaft eingesetzt werden dürfen. Die murine Nephrogenese setzt sich bis etwa zum 10. postnatalen Tag fort [78], während bei humanen Nieren die Nephrogenese bereits in der 36. SSW beendet wird [76], [77]. D.h. im dritten Trimenon vor der 36. SSW kann möglicherweise bereits die Einzelgabe eines COX-Inhibitors eine irreversible Störung der Nephrogenese zur Folge haben, da gerade in dieser Phase der Nephrogenese die COX-2 eine wichtige Rolle spielt.

Im Myometrium wird die COX-2 exprimiert, gerade im dritten Trimenon und direkt vor der Geburt spielen Prostaglandine eine große Rolle. Eine Hemmung dieses Enzyms führt zu einer Verminderung der Uteruskontraktionen, weshalb NSAIDs als Tokolytika angewendet werden können. Durch den Einsatz von Indomethacin und anderen Substanzen aus der Gruppe der NSAIDs konnte die Zahl der Geburten vor der 37. SSW reduziert werden [194], [195]. Bei der Mutter sind die unerwünschten Nebenwirkungen der NSAIDs im Vergleich zu anderen Tokolytika, wie Magnesiumsulfat und β -Sympathomimetika, geringer. Typischerweise kommt es zu unerwünschten Nebenwirkungen wie Übelkeit, Brechreiz, bei länge-

rer Anwendung zu Kopfschmerzen, Schwindel und Ohrensausen. Durch den Einsatz COX-2-selektiver Substanzen konnten die GIT-Nebenwirkungen reduziert werden [196], [197]. Allerdings besteht bei Feten die Gefahr einer Stenosierung des Ductus arteriosus Botalli mit resultierender pulmonaler Hypertonie [198] und die Gefahr einer Darm- und intrazerebralen Blutung [199]. Ebenfalls wurde über die Entstehung eines Oligohydramnions nach Tokolyse mit Indomethacin berichtet, infolge einer verminderten fetale Urinproduktion [125], [200]. Es gibt zahlreiche Studien und Fallberichte, die Hinweise darauf geben, dass bereits die kurzfristige und vorübergehende Behandlung mit NSAIDs, über 48 bis 72 h, zu einer strukturellen Veränderung des Nierenparenchyms führt. Nach NSAID-Gabe im dritten Trimenon der Schwangerschaft wurde sogar über das Auftreten letaler Nierenversagen berichtet [201], [202], des weiteren kam es unter Behandlung mit NSAIDs während des zweiten und dritten Trimenons der Schwangerschaft zur Dysgenese der Niere, die sich u.a. in einer inkompletten Differenzierung der Tubuli, mikrozystischen Veränderungen und hypoplastischen Nierenbecken zeigte [203], [204]. NSAIDs zur Tokolyse sind bei vorbestehendem Oligohydramnion deshalb absolut kontraindiziert.

Des weiteren gibt es Hinweise darauf, dass die Störung der Nephrogenese Effekte auf das Kreislaufsystem hat beispielsweise im Sinne einer arteriellen Hypertonie im Erwachsenenalter. Die Studien an den AT1-Rezeptor^(-/-)-Mäusen unterstreichen diese Fakten, da sich in diesen Studien ebenfalls eine Störung der Nephrogenese zeigte mit nachfolgender Entwicklung einer Hypertonie adulter Tiere. Des weiteren sah man bei Tieren die mit Glucocorticoiden behandelt wurden die Entstehung einer arteriellen Hypertonie [205].

NSAIDs verursachen bei Erwachsenen eine Natrium- und Wasserretention, deren Resultat Ödeme und eine Verschlechterung einer vorbestehenden arteriellen Hypertonie sein können [206]. Des weiteren wurde berichtet, dass NSAIDs und Coxibe eine chronische Herzinsuffizienz verschlechtern können, zu einem Anstieg des Serum-Kreatinins und eine Verschlechterung der GFR verursachen können [207].

Die Studien von Madsen *et al.* zeigten, dass auch hohe Corticosteroid-Gaben die COX-2-Expression in der sich entwickelnden Niere supprimierten [119]. Ebenso wurde in einem IUGR-Rattenmodell die COX-2-Expression, mutmaßlich aufgrund einer Corticosteroid-Ausschüttung, herunterreguliert [114], was nun auch den Gebrauch dieser häufig eingesetzten Medikamentengruppe bei Schwangeren in der Spätschwangerschaft in Frage stellen sollte. Allerdings muss bedacht werden, dass Corticosteroide essentiell für die Entwicklung einiger Organe, beispielsweise der Lungenreifung, sind und deshalb in manchen Situationen unverzichtbar zu sein scheinen. Liu *et al.* [208] beobachteten bei Ratten, dass die Gabe von Dexametason zu einem verminderten Wachstum von Körper und Nieren führte. Außerdem zeigten die Ratten danach einen schweren progressiven Nierenschaden mit Fibrose und einer chronischen Entzündung mit einer vermehrten Anzahl an Makrophagen in den Glomeruli. Auch entwickelten die Ratten nach Dexamethason eine arterielle Hypertonie, was in den Studien von Stubbe *et al.* auch beobachtet werden konnte [205]. Stubbe *et al.* konnten ebenfalls eine Störung der Nephrogenese sehen.

Auch hierzu könnten einige Studien, beispielsweise die Gabe von Corticosteroiden im Rahmen eines ähnlichen Studiendesigns, hinsichtlich der Histomorphometrie der Nieren größere Klarheit verschaffen. Weitere Untersuchungen bezüglich der Entwicklung einer arteriellen Hypertonie im Erwachsenenalter nach Gabe von Corticosteroiden und COX-2-Inhibitoren während der Nephrogenese wären ebenfalls sinnvoll.

Bei Menschen sind während der gesamten Schwangerschaft die Inhibitoren des RAAS kontraindiziert, da unter der Behandlung mit AT1-Rezeptor-Antagonisten und ACE-Inhibitoren vermehrt Oligohydramnien, sowie postnatales Nierenversagen, Hyperkaliämie und Hypotonie, fetale Wachstumsretardierung, pulmonale Hypoplasie, Fehlbildungen der Extremitäten und der knöchernen Kalotte aufgetreten sind [188], [189]. Die Nieren der Kinder von Müttern, die während der Schwangerschaft AT1-Antagonisten eingenommen haben, präsentieren wenig entwickelte Tubuli, vermehrt mesenchymales Gewebe, abnormal dicke Gefäßwände und hyperplastische juxtamedulläre Glomeruli [209].

Die Beobachtungen der mannigfaltigen Studien und Fallberichte zu diesem Thema, sowie die Beobachtungen der vorliegenden unterstreichen, dass NSAIDs oder andere Eingriffe in den Prostaglandinstoffwechsel, beispielsweise auch die Gabe von Glucocorticoiden während der Schwangerschaft, vor allem jedoch im zweiten und dritten Trimenon, dem letzten Abschnitt der Nephrogenese des Menschen, gut abzuwägen sind. Falls eine Pharmakotherapie unverzichtbar ist, sollte diese nur unter engmaschiger Kontrolle des Feten erfolgen und falls es möglich ist, ist die Pharmakotherapie zu unterlassen. Die Inhibitoren des RAAS sollten weiterhin nicht in der Schwangerschaft verabreicht werden.

4.4 Inhibition der GSK-3 β und Akt

Wie bei Enalapril und Telmisartan ergab sich bei dem GSK-3 β -Inhibitor und dem Akt-Inhibitor Triciribine ein Dosisproblem. Bei der zunächst gewählten Dosis von 1 mg/kg·KG verstarben bei beiden Substanzen die Mauswelpen. Bei einer reduzierten Dosis von 0,25 mg/kg·KG überlebten für unsere Untersuchung ausreichend Welpen.

Sowohl Triciribine, als auch der GSK-3 β -Inhibitor zeigen Effekte auf die von uns definierten Parameter der COX-2 abhängigen Nephrogenese. Neben den Nierenquotienten waren die Durchmesser der Glomeruli signifikant reduziert, für den GSK-3 β -Inhibitor jeweils deutlicher als für Triciribine. Die Reduktion des Durchmesser der Glomeruli reichte für den GSK-3 β -Inhibitor sogar in die Bereiche des COX-2-Inhibitors SC-236. Die kortikale Dicke war nur bei dem GSK-3 β -Inhibitor reduziert, ebenfalls war der Anteil der Glomeruli bei Triciribine nicht signifikant erhöht. Zunächst schien das Ergebnis unserer Studie paradox, da an bei Untersuchungen an adulten Tieren und Zellkulturen bislang berichtet wurde, dass die Akt die GSK-3 β durch Phosphorylierung negativ reguliert [173], [174].

4.4.1 Akt-Inhibitor: Triciribine

Die Studien an den Akt^{-/-}-Mäusen zeigten, dass sämtliche Organe zu klein sind [153], wobei eine nähere Beschreibung hierzu nicht vorliegt. In gewissem Sinn konnte diese Tatsache an den Nieren in dieser Studie über den erniedrigten Nierenquotienten ebenfalls gezeigt werden. Möglicherweise ist der Effekt, der durch die Akt-Hemmung erreicht wurde, auf den Mangel an COX-2 und anderen Faktoren, die an Zellwachstum und Differenzierung beteiligt sind, zurückzuführen. Ein möglicher Weg wäre der Signalweg über den *epidermal growth factor* (EGF), der über die PI3K, den Akt-Signalweg und über die PKA und PKC den ERK1/2-Signalweg aktiviert. Denkbar ist auch der IGF-1-Signalweg, der auch in mit RAAS-Inhibitoren behandelten Tieren herunter reguliert ist [150]. Eine Störung dieser Signalwege könnte gerade während der Entwicklung für eine gestörte Organogenese verantwortlich sein. Ein Schnittstelle in diesen Signalwegen scheint der Transkriptionsfaktor NF κ B zu sein. Die Aktivierung von NF κ B führt zu einer vermehrten Transkription u.a. der induzierbaren NO-Synthase (iNOS) und der COX-2. Unsere Beobachtungen würden einen Mangel an Wachstumsfaktoren und COX-2 indirekt über die Hemmung des Akt-Signalweges erklären. Da Akt in die Signalwege der Wachstumsfaktoren involviert ist [155], [156], ist es wahrscheinlich, dass der Akt-Signalweg während der Entwicklung ständig aktiviert ist.

4.4.2 GSK-3 β -Inhibitor

Eine Schwierigkeit in der Diskussion unserer Ergebnisse ergibt sich nun aus der Tatsache, dass eine Hemmung der GSK-3 β ebenfalls zu signifikanten Veränderungen der Nephrogenese im Sinne der von uns als COX-2 abhängigen Parameter definierten Nephrogenese führte. Kuure *et al.* zeigten, dass es durch pharmakologische Inhibition der GSK-3 durch Stabilisierung von β -Catenin sogar zur Induktion der Tubulogenese gekommen war [210]. In unseren Untersuchungen wurde das Tubulussystem nicht untersucht. Ebenso findet die Induktion der Tubulogenese bereits zu Beginn der Nephrogenese statt, weshalb wir mit unseren Untersuchungen hierzu keine Aussage machen können. Allerdings wären diese in Zellkulturen beobachteten Vorgänge interessant *in vivo* zu beobachten. Rao *et al.* konnten bei adulten Mäusen zeigen, dass die COX-2-Expression nach Inhibition der GSK-3 β mit Lithium ansteigt und hier über PGE2 eine Polyurie verursachte [170], [211]. Diese Ergebnisse erschweren die Argumentation an dieser Stelle noch zusätzlich.

Eine mögliche Erklärung findet sich nun in der Tatsache, dass die GSK-3 β auch den Glucocorticoid-Rezeptor phosphoryliert und damit dessen Aktivität reguliert. Ein Resultat dieser Regulation ist, dass über das abgeschwächte Glucocorticoid-Signal der Transkriptionsfaktor NF κ B vermehrt aktiviert und damit auch mehr COX-2 exprimiert wird [164], [212]. Wenn nun die GSK-3 β gehemmt wird, könnte es gerade in den ersten Lebensstagen der Mäuse, an denen es zur vermehrten Glucocorticoid-Ausschüttung

kommt, zu einem Überwiegen der Glucocorticoid-Wirkung kommen, was zur Suppression der COX-2 führen könnte und das empfindliche System stören würde. Die Glucocorticoide sind perinatal erhöht, ihre Wirkung wird beispielsweise auch durch die 11 β -HSD in der Niere reguliert [119].

Ein weiterer Ansatzpunkt ist die Studie von Takada *et al.* [168], die an GSK-3 β -defizienten Zellen gezeigt hat, dass es auf einen TNF-Trigger, sowie LPS und IL-1 hin nicht zur Aktivierung der Akt und NF κ B gekommen ist. TNF ist ein proinflammatorisches Zytokin, welches die Apoptose durch die Caspasen aktiviert und u.a. NF κ B, den MAP-Kinaseweg und den Akt-Signalweg aktiviert [213]. Des weiteren hat Takada *et al.* gezeigt, dass es in den GSK-3 β defizienten Zellen zur verminderten Expression der durch NF κ B regulierten Gene, wie z.B. Cyclin D1, COX-2 und Matrix-Metalloproteasen, gekommen war. Stattdessen führte der TNF-Trigger in den GSK-3 β -defizienten Zellen zur fulminanten Apoptose, was der Mangel an den genannten anti-apoptotischen Faktoren wie Cyclin D1 und COX-2 und die dann überschüssige Caspase-Aktivität erklärt. Takada *et al.* nimmt an, dass es ein positives Feedback zwischen der GSK-3 β und der Akt gibt [168]. Bislang war nur berichtet worden, dass die Akt durch Phosphorylierung die GSK-3 inaktiviert [173], [174]. Auch die Tatsache, dass Mäuse, die GSK-3 β defizient sind, nicht lebensfähig sind, da es wahrscheinlich aufgrund einer durch TNF induziert gestörten NF κ B-Aktivierung zur fulminanten Apoptose der Leberzellen während der Embryonalzeit kommt [166], unterstreicht die Bedeutung dieser Kinase für eine korrekte Embryo- und Organogenese. Schwabe *et al.* [214] berichteten ergänzend hierzu über eine Suppression der iNOS, die ebenfalls durch NF κ B reguliert wird, nach Inhibition der GSK-3. Für unseren Versuchsansatz könnte nun eine Erklärung sein, dass es durch die GSK-3 β -Inhibition nicht oder nur ausreichend zur Weiterleitung der Signale der Wachstumshormone während der Entwicklung kommt. Daraus könnte u.a. eine verminderte Aktivierung von NF κ B und dessen Gentranskripte resultieren, was die beobachteten Veränderungen an der Niere erklären könnte. Zwar wurde über eine erhöhte COX-2-Expression nach Inhibition der GSK-3 β berichtet [169], [170], allerdings wurden diese Beobachtungen an adulten Tieren gemacht, bei denen der Spiegel an Wachstumshormonen möglicherweise nicht so stark erhöht ist.

Wie bei der Akt ist anzunehmen, dass während der Entwicklung von Organen die Wirkungen der aktivierten Wachstumshormone auch über die GSK-3 β reguliert werden und deren Inhibition dieses System nachhaltig stören kann, das dann in einer gestörten Morphogenese in Erscheinung treten kann.

4.5 Signalwege, Schnittstellen?

Da die Kreuzungsstellen und die Mechanismen der drei erörterten Signalwege, der COX-2, des RAAS und des Akt/GSK-3-Weges längst nicht ausreichend erklärt scheinen, sind hierzu weitere Untersuchungen notwendig. Vor allem zu der Frage nach den Auswirkungen einer GSK-3-Inhibition sollten weitere Studien durchgeführt werden, da gerade hier in der Literatur widersprüchliche Quellen vorliegen. Hier

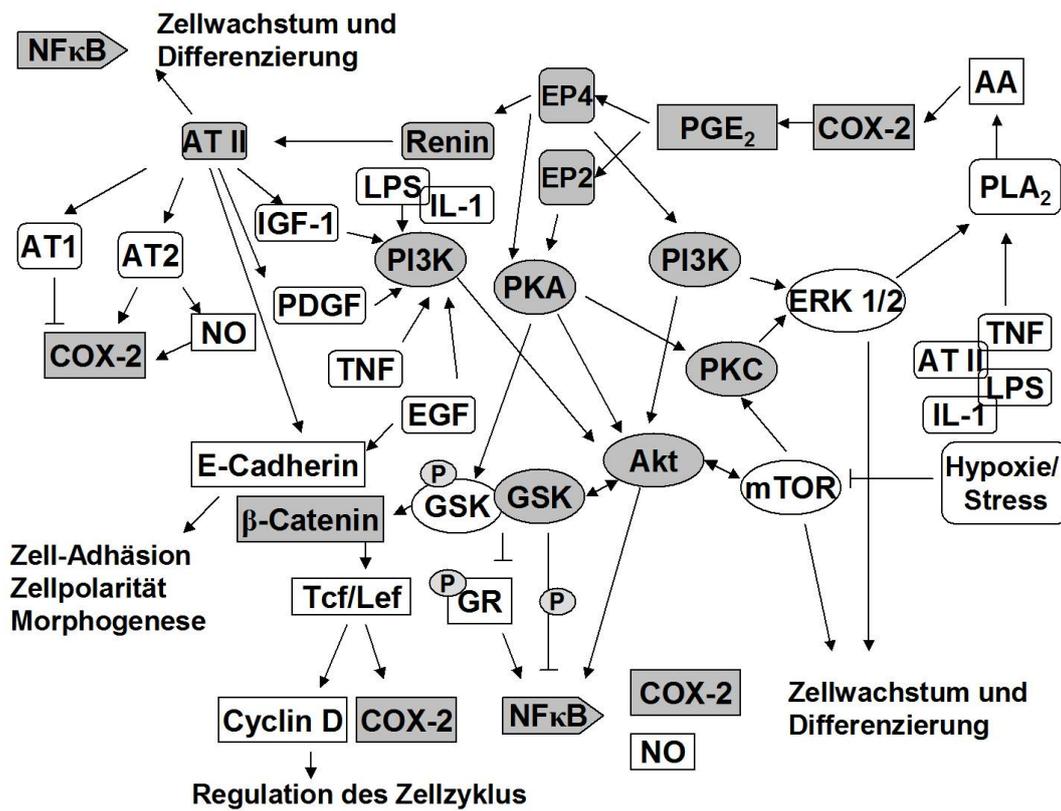


Abbildung 4.1: Darstellung der möglichen in dieser Arbeit diskutierten Signalwege. GR = Glucocorticoid-Rezeptor, = positive Regulation, T = negative Regulation, P = Phosphorylierung, weitere Abk. und Quellen siehe Text in Kapitel 1 und Kapitel 4.

stellt sich die Frage nach möglichen Unterschieden zwischen sich entwickelnden Tieren und adulten Tieren. Des weiteren wären genauere Untersuchungen zu den beiden AT II-Rezeptoren und deren Signalweiterleitung sinnvoll. Mechanismen und Kreuzungsstellen zwischen bekannten und möglichen Signalwegen zeigt Abb. 4.1.

Kapitel 5

Zusammenfassung

Die Nieren von COX-2^{-/-}-Mäusen zeigen um den Tag P21 u.a. einen verminderten Quotienten aus Nierengewicht zu Körpergewicht, zu kleine Glomeruli, einen schmalen Kortex und zystische Veränderungen, sowie hyperplastische Glomeruli in rindenfernen Bereichen. Die Befunde an den Nieren von COX-1^{-/-} und COX-2^{-/-} Mäusen lassen vermuten, dass es sich um COX-2 abhängige Effekte handelt, die erst im postnatalen Abschnitt der Nephrogenese in Erscheinung treten. Da COX-1^{-/-}-Mäuse keine Pathologien der Nieren aufweisen und es zwischen Wildtyp-Mäusen und COX-2^{-/-}-Mäusen an den ersten Tagen bis etwa Tag P10 keine Unterschiede des Phänotypes der Nieren gibt. Nach Gabe von Indomethacin während des letzten Trimenons der Schwangerschaft wurde auch bei Menschen über eine gestörte Nierenfunktion mit Oligohydramnion sowie histologischen Veränderungen berichtet. Bisher war allerdings unklar, inwiefern die unterschiedlich klinisch eingesetzten Coxibe sich in ihrer Wirkung auf die Nierenentwicklung unterscheiden und ob sie die Nephrogenese in gleichem Maße stören können. In der vorliegenden Arbeit wurde der postnatale Abschnitt der Nephrogenese von Mäusen unter Gabe der experimentellen COX-2 Inhibitoren SC-236 und SC-791, der selektiven COX-2-Inhibitoren Celecoxib, Etoricoxib, Lumiracoxib, Rofecoxib und Valdecoxib, der klassischen NSAIDs Diclofenac und Naproxen, der experimentelle COX-1 Inhibitor SC-560 und das Celecoxib-Derivat DMC untersucht. Als Referenzgruppe diente eine Gruppe von Mäusen, die gleiche Volumina an DMSO, dem Lösungsmittel aller Substanzen, erhielt. Zunächst wurden die Tiere von Tag P1 bis Tag P21 mit den oben genannten Substanzen nach einem festen Schema behandelt, anschließend wurden die Nieren präpariert und histologisch aufgearbeitet. Als Parameter der Untersuchung der Nierenentwicklung wurde die Reduktion der Nierenquotienten, der mittleren Durchmesser der Glomeruli und der kortikalen Dicke, sowie der Anteil an Glomeruli im Rindbereich und einer Verschiebung der Verteilung der Glomeruli, hin zu kleineren Durchmessern herangezogen. Verglichen mit der Referenzgruppe, die keine Veränderungen der Nephrogenese gezeigt hatte, zeigte sich ein Effekt auf die Morphologie der Nieren in unterschiedlichem Ausmaß, bei allen selektiven COX-2-Inhibitoren, sowie den klassischen NSAIDs. Weder SC-560, noch DMC zeigten bei dieser Studie einen Effekt auf die Nephrogenese. Des weiteren wurde

in der vorliegenden Arbeit untersucht ob und an welchen postnatalen Tagen die COX-2-Expression erhöht ist. Dazu wurden an den Tagen P2, P4, P6 und P8, sowie an Tag P21 unbehandelte C57/BL6-Mäuse getötet und deren Nieren entnommen. Sowohl auf mRNA, als auch auf Proteinebene konnte an Tag P4 in den TaqMan-Analysen, bzw. an Tag P6 in den Western Blot-Analysen eine signifikant erhöhte Expression der COX-2, verglichen mit Tag P21 festgestellt werden. Daraus ergab sich nun die Frage, ob die Inhibition der COX-2 an diesen Tagen ausreicht, eine Veränderung im Sinne der oben genannten Veränderungen an der Niere zu zeigen. Dazu wurde eine Gruppe von Tieren nur von Tag P1 bis Tag P6 mit dem experimentellen COX-2-Inhibitor SC-236 behandelt und an Tag P21 mit Tieren verglichen, die entweder von Tag P1 bis Tag P21 SC-236 erhielten oder das Lösungsmittel DMSO. Die Nieren zeigten ebenfalls signifikante Unterschiede zu den Nieren aus der Referenzgruppe. Die Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass es sich um einen Gruppeneffekt der NSAIDs auf die COX-2 abhängige Nephrogenese handelt. Des weiteren zeigte sich, dass die COX-2-Expression in den Nieren an den ersten Lebensstagen der Maus erhöht ist und die COX-2 Inhibition an diesen Tagen eine irreversible Störung der Nephrogenese nach sich zieht. Die Konsequenz aus diesen Ergebnissen sollte sein, dass NSAIDs nicht mehr in der Spätschwangerschaft, z.B. zur Tokolyse oder zur Behandlung des Polyhydramnions eingesetzt werden.

Ein weiterer Teil dieser Arbeit beschäftigte sich mit der Tatsache, dass auch bei $AT1^{-/-}$ - und $ACE^{-/-}$ -Mäusen über eine veränderte Morphologie der Nieren berichtet wurde. Des weiteren sind beide Systeme, COX-2 und RAAS, an der Regulation der Nierenphysiologie beteiligt und verknüpft. In der vorliegenden Arbeit wurde nun die Wirkung des ACE-Inhibitors Enalapril und des $AT1$ -Antagonisten Telmisartan auf Parallelen zur COX-2 abhängigen Nephrogenese untersucht. Lediglich die Nierenquotienten waren bei beiden Substanzen vermindert. Es zeigten sich bei der Behandlung mit Enalapril verminderte Volumina der Glomeruli, eine verminderte kortikale Dicke und ein erhöhter Anteil von Glomeruli im Rindbereich.

Des weiteren gibt es Hinweise, dass über PGE2 der Akt und GSK-3-Signalweg mit dem COX-2-System verknüpft ist. $Akt^{-/-}$ -Mäuse des Subtyp 1 und 3 zeigen sämtlich zu kleine Organe. $GSK-3\beta^{-/-}$ -Mäuse sind nicht lebensfähig und versterben während der Embryonalzeit an den Tagen E14/E15, wahrscheinlich aufgrund einer Fehlregulation des Transkriptionsfaktors $NF\kappa B$. Neben der Tatsache, dass PGE2 in die Signalwege der Akt/GSK-3 involviert ist, gibt es Hinweise auf eine wichtige Rolle dieser Kinasen für die Organogenese. Deshalb wurde in der vorliegenden Studie ein GSK-3 β -Inhibitor und der Akt-Inhibitor Triciribine verabreicht. Nach dem gleichen Schema wurden die Tiere von Tag P1 bis P21 mit diesen Substanzen behandelt. Es zeigte sich bei beiden Substanzen ein verminderter Nierenquotient und mittlerer Durchmesser der Glomeruli. Die kortikale Dicke und der Anteil der Glomeruli im Rindbereich zeigte nur bei den mit GSK-3 β -Inhibitor behandelten Tieren einen Effekt. Diese Ergebnisse erschienen zunächst widersprüchlich, da von einigen Autoren darüber

berichtet wird, dass die Akt die GSK-3 negativ reguliert. Allerdings scheinen sich die beiden Enzyme gegenseitig zu regulieren. Die GSK-3 β ist zudem an der Regulation des Glucocorticoid-Rezeptors beteiligt der u.a. auch an der Regulation der COX-2-Expression beteiligt ist.

Kapitel 6

Abstract

Kidneys of COX-2^{-/-} mice show reduced kidney to body weight ratio, dysplasia of the outer cortex with small subcapsular glomeruli and cystic lesions and inner cortical hypertrophy of nephrons and glomeruli, whereas disruption of the COX-1 gene does not result in any renal pathologies. These findings indicate that COX-2 activity is critical for the maintenance of normal renal architecture. Renal abnormalities appear at the earliest from postnatal day P10, which suggests a role of COX-2 activity in postnatal kidney development. After treatment with NSAIDs during the 2nd and 3rd trimester of pregnancy in humans impaired renal function and altered renal morphology has been reported. In the present work we investigated postnatal nephrogenesis of mice treated with the experimental isozyme specific COX-2 inhibitors SC-236 and SC-791, the isozyme specific COX-2 inhibitors Celecoxib, Etoricoxib, Lumiracoxib, Rofecoxib and Valdecoxib already used in clinical practice, the traditional NSAIDs Diclofenac and Naproxen, as well as the experimental isozyme specific COX-1 inhibitor SC-560 and DMC, a derivative of Celecoxib, which does not show any intrinsic COX inhibition. All substances were dissolved in DMSO, which has been shown in this study not to affect nephrogenesis in mice.

Initially, C57/BL6 mice were treated with the substances mentioned above starting from postnatal day P1 to P21. Alterations such as the reduction of kidney to body weight ratio, mean diameter of glomeruli and cortical thickness, as well as increased amount of outer cortical glomeruli and shift of distribution of glomeruli, to the smaller ones, have been seen in the kidneys of all mice treated with isozyme specific COX-2 inhibitors, as well as traditional NSAIDs. No alterations have been observed in kidneys treated with DMC and SC-560. These results suggest a group effect of all NSAIDs, either specific or nonspecific for COX-2 isozyme. Furthermore we investigated, whether there is any COX-2 expression in mouse kidneys during the first postnatal days. For this purpose pups were killed and kidneys prepared at postnatal day P2, P4, P6, P8 and P21. Using TagMan RT-PCR analysis, increased levels of COX-2 mRNA were detected in kidneys of mice killed at day P4 compared to kidneys of those killed at day P21. According to that finding higher levels of COX-2 protein were detected in kidneys of mice killed at day P4, P6 and P8 using Western Blot analysis. Only the value of day P6 was

significantly increased.

This brings up the question whether COX-2 inhibition at days with high expression results in kidney alterations. Therefore, one group of mice was treated with SC-236 starting from postnatal day P1 to P6, while a second group was treated with SC-236 from day P1 to P21. Animals of both groups were killed at postnatal day P21 and histomorphology of the kidneys of animals of both groups was compared to the one of animals of the same age treated with DMSO alone. Both treatment from P1 to P6 and treatment from P1 to P21 resulted in significant alterations of kidney morphogenesis compared to the reference group. Among the study groups no difference concerning to kidney to body weight ratio, mean diameter of glomeruli and cortical thickness appeared. Consequently, it might be appropriate not to use any NSAIDs during the 2nd and 3rd trimester of pregnancy, frequently done e.g. for tocolysis and treatment of polyhydramnion.

Another aim of this work was to illuminate the circumstance that $AT1^{-/-}$ and $ACE^{-/-}$ mice present altered kidney morphologies too, but not the same alterations seen in $COX-2^{-/-}$ mice. Pathways of RAAS and COX-2 are highly interwoven in renal physiology. Therefore we investigated the impact of the ACE inhibitor Enalapril and AT1 receptor antagonist Telmisartan on nephrogenesis in mice compared to the one of COX-2 inhibitors. Only kidney to body weight ratio was altered in both groups, while only kidneys of mice treated with Enalapril presented alterations of the other parameters of nephrogenesis. However kidneys of mice treated with Enalapril did not show as many hypertrophic glomeruli in the inner cortex compared to kidneys of animals treated with COX-2 inhibitors. Possibly deduce from a different mechanism. Other references show that PGE_2 receptors EP2 and EP4 are involved in Akt/GSK-3 signaling. $Akt^{-/-}$ mice generally show small organs. $GSK-3^{-/-}$ mice die at embryonic day E14/E15, probably from missed regulation of $NF\kappa B$. Hence, we decided to investigate nephrogenesis under treatment with a $GSK-3\beta$ inhibitor and the Akt inhibitor Triciribine. C57/BL6 mice were treated with inhibitors by the standard treatment mentioned above. Both $GSK-3\beta$ inhibitor and Triciribine led to reduction of kidney to body weight ratio and mean diameter of glomeruli. Reduction of cortical thickness and increased amount of outer cortical glomeruli was observed in kidneys of mice treated with $GSK-3\beta$ inhibitor only. These results seemed to be paradox, because it has been reported that GSK-3 is regulated negatively by Akt. But there is also evidence that GSK-3 directly regulates Akt and vice versa. Furthermore the glucocorticoid receptor (GR) is a substrate of GSK-3, which, amongst others, regulates activity of $NF\kappa B$ and the COX-2 isozyme. GSK-3 regulates the GR negatively.

Literaturverzeichnis

- [1] Diaz BL, Arm JP: Phospholipase A(2). Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids 69:87-97, 2003
- [2] Warner TD, Mitchell JA: Cyclooxygenases: new forms, new inhibitors, and lessons from the clinic. Faseb J 18:790-804, 2004
- [3] Fu JY, Masferrer JL, Seibert K, *et al.*: The induction and suppression of prostaglandin H2 synthase (cyclooxygenase) in human monocytes. J Biol Chem 265:16737-16740, 1990
- [4] Narumiya S, Sugimoto Y, Ushikubi F: Prostanoid receptors: structures, properties, and functions. Physiol Rev 79:1193-1226, 1999
- [5] Kurumbail RG, Stevens AM, Gierse JK, *et al.*: Structural basis for selective inhibition of cyclooxygenase-2 by anti-inflammatory agents. Nature 384:644-648, 1996
- [6] Marnett LJ, Rowlinson SW, Goodwin DC, *et al.*: Arachidonic acid oxygenation by COX-1 and COX-2. Mechanisms of catalysis and inhibition. J Biol Chem 274:22903-22906, 1999
- [7] Shimokawa T, Kulmacz RJ, DeWitt DL, *et al.*: Tyrosine 385 of prostaglandin endoperoxide synthase is required for cyclooxygenase catalysis. J Biol Chem 265:20073-20076, 1990
- [8] Simmons DL, Botting RM, Hla T: Cyclooxygenase isozymes: the biology of prostaglandin synthesis and inhibition. Pharmacol Rev 56:387-437, 2004
- [9] Appleby SB, Ristimaki A, Neilson K, *et al.*: Structure of the human cyclo-oxygenase-2 gene. Biochem J 302:723-727., 1994
- [10] Seibert K, Zhang Y, Leahy K, *et al.*: Distribution of COX-1 and COX-2 in normal and inflamed tissues. Adv Exp Med Biol 400A:167-170, 1997
- [11] Kargman S, Charleson S, Cartwright M, *et al.*: Characterization of Prostaglandin G/H Synthase 1 and 2 in rat, dog, monkey, and human gastrointestinal tracts. Gastroenterology 111:445-454, 1996
- [12] Dubois RN, Abramson SB, Crofford L, *et al.*: Cyclooxygenase in biology and disease. Faseb J 12:1063-1073, 1998
- [13] Harris RC, McKanna JA, Akai Y, *et al.*: Cyclooxygenase-2 is associated with the macula densa of rat kidney and increases with salt restriction. J Clin Invest 94:2504-2510, 1994
- [14] Nantel F, Meadows E, Denis D, *et al.*: Immunolocalization of cyclooxygenase-2 in the macula densa of human elderly. FEBS Lett 457:475-477, 1999
- [15] Mutschler E, Geisslinger G, Kroemer H, *et al.*: Mutschler Arzneimittelwirkungen, 8., völlig neu bearbeitete und erweiterte Auflage ed, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, 2001
- [16] Vane JR: Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for Aspirin-like drugs. Nature 231:232-235, 1971
- [17] Vane JR, Botting RM: Mechanism of action of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. Am J Med 104:2S-8S; discussion 21S-22S, 1998

- [18] Whelton A, Fort JG, Puma JA, *et al.*: Cyclooxygenase-2-specific inhibitors and cardiorenal function: a randomized, controlled trial of celecoxib and rofecoxib in older hypertensive osteoarthritis patients. *Am J Ther* 8:85-95, 2001
- [19] Riendeau D, Percival MD, Brideau C, *et al.*: Etoricoxib (MK-0663): preclinical profile and comparison with other agents that selectively inhibit cyclooxygenase-2. *J Pharmacol Exp Ther* 296:558-566, 2001
- [20] Esser R, Berry C, Du Z, *et al.*: Preclinical pharmacology of lumiracoxib: a novel selective inhibitor of cyclooxygenase-2. *Br J Pharmacol* 144:538-550, 2005
- [21] Burian M, Geisslinger G: [Clinical pharmacology of the selective COX-2 inhibitors]. *Orthopade* 32:1078-1087, 2003
- [22] Steinbach G, Lynch PM, Phillips RK, *et al.*: The effect of celecoxib, a cyclooxygenase-2 inhibitor, in familial adenomatous polyposis. *N Engl J Med* 342:1946-1952, 2000
- [23] Bresalier RS, Sandler RS, Quan H, *et al.*: Cardiovascular events associated with rofecoxib in a colorectal adenoma chemoprevention trial. *N Engl J Med* 352:1092-1102, 2005
- [24] Bombardier C, Laine L, Reicin A, *et al.*: Comparison of upper gastrointestinal toxicity of rofecoxib and naproxen in patients with rheumatoid arthritis. VIGOR Study Group. *N Engl J Med* 343:1520-1528, 2000
- [25] Johnsen S, Hughes S, Bullock R, *et al.*: Prediction of the rate of decline in cognitive function in Alzheimer's disease: a correction. *Dement Geriatr Cogn Disord* 18:349-350, 2004
- [26] Silverstein FE, Faich G, Goldstein JL, *et al.*: Gastrointestinal toxicity with celecoxib vs nonsteroidal anti-inflammatory drugs for osteoarthritis and rheumatoid arthritis: the CLASS study: A randomized controlled trial. Celecoxib Long-term Arthritis Safety Study. *Jama* 284:1247-1255., 2000
- [27] Farkouh ME, Kirshner H, Harrington RA, *et al.*: Comparison of lumiracoxib with naproxen and ibuprofen in the Therapeutic Arthritis Research and Gastrointestinal Event Trial (TARGET), cardiovascular outcomes: randomised controlled trial. *Lancet* 364:675-684, 2004
- [28] Schnitzer TJ, Burmester GR, Mysler E, *et al.*: Comparison of lumiracoxib with naproxen and ibuprofen in the Therapeutic Arthritis Research and Gastrointestinal Event Trial (TARGET), reduction in ulcer complications: randomised controlled trial. *Lancet* 364:665-674, 2004
- [29] Nussmeier NA, Whelton AA, Brown MT, *et al.*: Complications of the COX-2 inhibitors parecoxib and valdecoxib after cardiac surgery. *N Engl J Med* 352:1081-1091, 2005
- [30] Laine L, Curtis SP, Cryer B, *et al.*: Assessment of upper gastrointestinal safety of etoricoxib and diclofenac in patients with osteoarthritis and rheumatoid arthritis in the Multinational Etoricoxib and Diclofenac Arthritis Long-term (MEDAL) programme: a randomised comparison. *Lancet* 369:465-473, 2007
- [31] Smith WL, Bell TG: Immunohistochemical localization of the prostaglandin-forming cyclooxygenase in renal cortex. *Am J Physiol* 235:F451-457, 1978
- [32] Kömhoff M, Grne HJ, Klein T, *et al.*: Localization of cyclooxygenase-1 and -2 in adult and fetal human kidney: implication for renal function. *Am J Physiol* 272:F460-468, 1997
- [33] Yang T, Singh I, Pham H, *et al.*: Regulation of cyclooxygenase expression in the kidney by dietary salt intake. *Am J Physiol*. 274:F481-489., 1998
- [34] Adegboyega PA, Ololade O: Immunohistochemical expression of cyclooxygenase-2 in normal kidneys. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 12:71-74, 2004
- [35] Guan Y, Chang M, Cho W, *et al.*: Cloning, expression, and regulation of rabbit cyclooxygenase-2 in renal medullary interstitial cells. *Am J Physiol* 273:F18-26, 1997

- [36] Yang T, Schnermann JB, Briggs JP: Regulation of cyclooxygenase-2 expression in renal medulla by tonicity in vivo and in vitro. *Am J Physiol* 277:F1-9, 1999
- [37] Schneider A, Zhang Y, Zhang M, *et al.*: Membrane-associated PGE synthase-1 (mPGES-1) is coexpressed with both COX-1 and COX-2 in the kidney. *Kidney Int* 65:1205-1213, 2004
- [38] Campean V, Theilig F, Paliege A, *et al.*: Key enzymes for renal prostaglandin synthesis: site-specific expression in rodent kidney (rat, mouse). *Am J Physiol Renal Physiol* 285:F19-32, 2003
- [39] Brater DC, Harris C, Redfern JS, *et al.*: Renal effects of COX-2-selective inhibitors. *Am J Nephrol* 21:1-15, 2001
- [40] Kuhlmann U, Walb D, Böhler J, *et al.*: *Nephrologie*, Georg Thieme Verlag, 2008
- [41] Harris RC: COX-2 and the kidney. *J Cardiovasc Pharmacol* 47 Suppl 1:S37-42, 2006
- [42] Breyer MD, Zhang Y, Guan YF, *et al.*: Regulation of renal function by prostaglandin E receptors. *Kidney Int Suppl* 67:S88-94, 1998
- [43] Breyer MD, Breyer RM: G protein-coupled prostanoid receptors and the kidney. *Annu Rev Physiol* 63:579-605, 2001
- [44] Morath R, Klein T, Seyberth HW, *et al.*: Immunolocalization of the four prostaglandin E2 receptor proteins EP1, EP2, EP3, and EP4 in human kidney. *J Am Soc Nephrol* 10:1851-1860, 1999
- [45] Guan Y, Zhang Y, Breyer RM, *et al.*: Prostaglandin E2 inhibits renal collecting duct Na⁺ absorption by activating the EP1 receptor. *J Clin Invest* 102:194-201, 1998
- [46] Breyer MD, Breyer RM: Prostaglandin E receptors and the kidney. *Am J Physiol Renal Physiol* 279:F12-23, 2000
- [47] Breyer MD, Breyer RM: Prostaglandin receptors: their role in regulating renal function. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 9:23-29, 2000
- [48] Kennedy CR, Zhang Y, Brandon S, *et al.*: Salt-sensitive hypertension and reduced fertility in mice lacking the prostaglandin EP2 receptor. *Nat Med* 5:217-220, 1999
- [49] Csukas S, Hanke CJ, Rewolinski D, *et al.*: Prostaglandin E2-induced aldosterone release is mediated by an EP2 receptor. *Hypertension* 31:575-581, 1998
- [50] Sugimoto Y, Namba T, Honda A, *et al.*: Cloning and expression of a cDNA for mouse prostaglandin E receptor EP3 subtype. *J Biol Chem* 267:6463-6466, 1992
- [51] Jensen BL, Stubbe J, Hansen PB, *et al.*: Localization of prostaglandin E(2) EP2 and EP4 receptors in the rat kidney. *Am J Physiol Renal Physiol* 280:F1001-1009, 2001
- [52] Sugimoto Y, Narumiya S, Ichikawa A: Distribution and function of prostanoid receptors: studies from knockout mice. *Prog Lipid Res* 39:289-314, 2000
- [53] Persson AE, Salomonsson M, Westerlund P, *et al.*: Macula densa cell function. *Kidney Int Suppl* 32:S39-44, 1991
- [54] Cheng HF, Harris RC: Cyclooxygenase-2 expression in cultured cortical thick ascending limb of Henle increases in response to decreased extracellular ionic content by both transcriptional and post-transcriptional mechanisms. Role of p38-mediated pathways. *J Biol Chem* 277:45638-45643, 2002
- [55] Hakam AC, Hussain T: Angiotensin II AT2 receptors inhibit proximal tubular Na⁺-K⁺-ATPase activity via a NO/cGMP-dependent pathway. *Am J Physiol Renal Physiol* 290:F1430-1436, 2006
- [56] Carey RM: Cardiovascular and renal regulation by the angiotensin type 2 receptor: the AT2 receptor comes of age. *Hypertension* 45:840-844, 2005

- [57] Zhang MZ, Yao B, Cheng HF, *et al.*: Renal cortical cyclooxygenase 2 expression is differentially regulated by angiotensin II AT(1) and AT(2) receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:16045-16050, 2006
- [58] Cheng HF, Wang JL, Zhang MZ, *et al.*: Angiotensin II attenuates renal cortical cyclooxygenase-2 expression. *J Clin Invest* 103:953-961, 1999
- [59] Wolf K, Castrop H, Hartner A, *et al.*: Inhibition of the renin-angiotensin system upregulates cyclooxygenase-2 expression in the macula densa. *Hypertension* 34:503-507, 1999
- [60] Harris RC: Interactions between COX-2 and the renin-angiotensin system in the kidney. *Acta Physiol Scand* 177:423-427, 2003
- [61] Wang JL, Cheng HF, Harris RC: Cyclooxygenase-2 inhibition decreases renin content and lowers blood pressure in a model of renovascular hypertension. *Hypertension* 34:96-101, 1999
- [62] Frolich JC, Hollifield JW, Dormois JC, *et al.*: Suppression of plasma renin activity by indomethacin in man. *Circ Res* 39:447-452, 1976
- [63] Frolich JC, Hollifield JW, Michelakis AM, *et al.*: Reduction of plasma renin activity by inhibition of the fatty acid cyclooxygenase in human subjects: independence of sodium retention. *Circ Res* 44:781-787, 1979
- [64] Larsson C, Weber P, Anggard E: Arachidonic acid increases and indomethacin decreases plasma renin activity in the rabbit. *Eur J Pharmacol* 28:391-394, 1974
- [65] Matzdorf C, Kurtz A, Hocherl 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:F1782-1790, 2007
- [66] Hackenthal E, Schwertschlag U, Seyberth HW: Prostaglandins and renin release studies in the isolated perfused rat kidney. *Prog Biochem Pharmacol* 17:98-107, 1980
- [67] Gerber JG, Keller RT, 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
- [68] Jensen BL, Schmid C, Kurtz A: Prostaglandins stimulate renin secretion and renin mRNA in mouse renal juxtaglomerular cells. *Am J Physiol* 271:F659-669, 1996
- [69] Hartner A, Goppelt-Struebe M, Hilgers KF: Coordinate expression of cyclooxygenase-2 and renin in the rat kidney in renovascular hypertension. *Hypertension* 31:201-205, 1998
- [70] Schnermann J: Juxtaglomerular cell complex in the regulation of renal salt excretion. *Am J Physiol* 274:R263-279, 1998
- [71] Dinchuk JE, Car BD, Focht RJ, *et al.*: Renal abnormalities and an altered inflammatory response in mice lacking cyclooxygenase II. *Nature* 378:406-409, 1995
- [72] Morham SG, Langenbach R, Loftin CD, *et al.*: Prostaglandin synthase 2 gene disruption causes severe renal pathology in the mouse. *Cell* 83:473-482, 1995
- [73] Norwood VF, Morham SG, Smithies O: Postnatal development and progression of renal dysplasia in cyclooxygenase-2 null mice. *Kidney Int* 58:2291-2300, 2000
- [74] Saxen L, Sariola H: Early organogenesis of the kidney. *Pediatr Nephrol* 1:385-392, 1987
- [75] Drews UT: Taschenatlas der Embryologie, Georg Thieme Verlag, 1993
- [76] Mitchell EK, Louey S, Cock ML, *et al.*: Nephron endowment and filtration surface area in the kidney after growth restriction of fetal sheep. *Pediatr Res* 55:769-773, 2004
- [77] Vanderheyden T, Kumar S, Fisk NM: Fetal renal impairment. *Semin Neonatol* 8:279-289, 2003

- [78] Potter E: Normal and Abnormal Development of the kidney. Year Book Medical Publishers, Chicago, 1972
- [79] Torres M, Gomez-Pardo E, Dressler GR, *et al.*: Pax-2 controls multiple steps of urogenital development. *Development* 121:4057-4065, 1995
- [80] Shawlot W, Behringer RR: Requirement for Lim1 in head-organizer function. *Nature* 374:425-430, 1995
- [81] Stanton BR, Perkins AS, Tessarollo L, *et al.*: Loss of N-myc function results in embryonic lethality and failure of the epithelial component of the embryo to develop. *Genes Dev* 6:2235-2247, 1992
- [82] Kreidberg JA, Sariola H, Loring JM, *et al.*: WT-1 is required for early kidney development. *Cell* 74:679-691, 1993
- [83] Xu PX, Adams J, Peters H, *et al.*: Eya1-deficient mice lack ears and kidneys and show abnormal apoptosis of organ primordia. *Nat Genet* 23:113-117, 1999
- [84] Trumpp A, Blundell PA, de la Pompa JL, *et al.*: The chicken limb deformity gene encodes nuclear proteins expressed in specific cell types during morphogenesis. *Genes Dev* 6:14-28, 1992
- [85] Robertson K, Mason I: The GDNF-RET signalling partnership. *Trends Genet* 13:1-3, 1997
- [86] Schuchardt A, D'Agati V, Larsson-Blomberg L, *et al.*: Defects in the kidney and enteric nervous system of mice lacking the tyrosine kinase receptor Ret. *Nature* 367:380-383, 1994
- [87] Bullock SL, Fletcher JM, Beddington RS, *et al.*: Renal agenesis in mice homozygous for a gene trap mutation in the gene encoding heparan sulfate 2-sulfotransferase. *Genes Dev* 12:1894-1906, 1998
- [88] Muller U, Wang D, Denda S, *et al.*: Integrin alpha8beta1 is critically important for epithelial-mesenchymal interactions during kidney morphogenesis. *Cell* 88:603-613, 1997
- [89] Hogan BL: Bone morphogenetic proteins: multifunctional regulators of vertebrate development. *Genes Dev* 10:1580-1594, 1996
- [90] Miyamoto N, Yoshida M, Kuratani S, *et al.*: Defects of urogenital development in mice lacking Emx2. *Development* 124:1653-1664, 1997
- [91] Stark K, Vainio S, Vassileva G, *et al.*: Epithelial transformation of metanephric mesenchyme in the developing kidney regulated by Wnt-4. *Nature* 372:679-683, 1994
- [92] Soriano P: Abnormal kidney development and hematological disorders in PDGF beta-receptor mutant mice. *Genes Dev* 8:1888-1896, 1994
- [93] Qiao J, Uzzo R, Obara-Ishihara T, *et al.*: FGF-7 modulates ureteric bud growth and nephron number in the developing kidney. *Development* 126:547-554, 1999
- [94] Moser M, Pscherer A, Roth C, *et al.*: Enhanced apoptotic cell death of renal epithelial cells in mice lacking transcription factor AP-2beta. *Genes Dev* 11:1938-1948, 1997
- [95] Veis DJ, Sorenson CM, Shutter JR, *et al.*: Bcl-2-deficient mice demonstrate fulminant lymphoid apoptosis, polycystic kidneys, and hypopigmented hair. *Cell* 75:229-240, 1993
- [96] Hatini V, Huh SO, Herzlinger D, *et al.*: Essential role of stromal mesenchyme in kidney morphogenesis revealed by targeted disruption of Winged Helix transcription factor BF-2. *Genes Dev* 10:1467-1478, 1996
- [97] Kuure S, Vuolteenaho R, Vainio S: Kidney morphogenesis: cellular and molecular regulation. *Mech Dev* 92:31-45, 2000

- [98] Lynch SA, Wright C: Sirenomelia, limb reduction defects, cardiovascular malformation, renal agenesis in an infant born to a diabetic mother. *Clin Dysmorphol* 6:75-80, 1997
- [99] Soler NG, Walsh CH, Malins JM: Congenital malformations in infants of diabetic mothers. *Q J Med* 45:303-313, 1976
- [100] Woolf AS: Multiple causes of human kidney malformations. *Arch Dis Child* 77:471-473, 1997
- [101] Kanwar YS, Nayak B, Lin S, *et al.*: Hyperglycemia: its imminent effects on mammalian nephrogenesis. *Pediatr Nephrol* 20:858-866, 2005
- [102] Dahl E, Koseki H, Balling R: Pax genes and organogenesis. *Bioessays* 19:755-765, 1997
- [103] Dressler GR, Deutsch U, Chowdhury K, *et al.*: Pax2, a new murine paired-box-containing gene and its expression in the developing excretory system. *Development* 109:787-795, 1990
- [104] Bouchard M, Souabni A, Mandler M, *et al.*: Nephric lineage specification by Pax2 and Pax8. *Genes Dev* 16:2958-2970, 2002
- [105] Dressler GR: Pax-2, kidney development, and oncogenesis. *Med Pediatr Oncol* 27:440-444, 1996
- [106] Dziarmaga A, Clark P, Stayner C, *et al.*: Ureteric bud apoptosis and renal hypoplasia in transgenic PAX2-Bax fetal mice mimics the renal-coloboma syndrome. *J Am Soc Nephrol* 14:2767-2774, 2003
- [107] Eccles MR, He S, Legge M, *et al.*: PAX genes in development and disease: the role of PAX2 in urogenital tract development. *Int J Dev Biol* 46:535-544, 2002
- [108] Porteous S, Torban E, Cho NP, *et al.*: Primary renal hypoplasia in humans and mice with PAX2 mutations: evidence of increased apoptosis in fetal kidneys of Pax2(1Neu) +/- mutant mice. *Hum Mol Genet* 9:1-11, 2000
- [109] Favor J, Sandulache R, Neuhauser-Klaus A, *et al.*: The mouse Pax2(1Neu) mutation is identical to a human PAX2 mutation in a family with renal-coloboma syndrome and results in developmental defects of the brain, ear, eye, and kidney. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:13870-13875, 1996
- [110] Coppes MJ, Campbell CE, Williams BR: The role of WT1 in Wilms tumorigenesis. *Faseb J* 7:886-895, 1993
- [111] Zhang SL, Chen YW, Tran S, *et al.*: Reactive oxygen species in the presence of high glucose alter ureteric bud morphogenesis. *J Am Soc Nephrol* 18:2105-2115, 2007
- [112] Economides DL, Nicolaidis KH: Blood glucose and oxygen tension levels in small-for-gestational-age fetuses. *Am J Obstet Gynecol* 160:385-389, 1989
- [113] Silver LE, Decamps PJ, Korst LM, *et al.*: Intrauterine growth restriction is accompanied by decreased renal volume in the human fetus. *Am J Obstet Gynecol* 188:1320-1325, 2003
- [114] Baserga M, Hale MA, Wang ZM, *et al.*: Uteroplacental insufficiency alters nephrogenesis and downregulates cyclooxygenase-2 expression in a model of IUGR with adult-onset hypertension. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 292:R1943-1955, 2007
- [115] Bauer R, Walter B, Bauer K, *et al.*: Intrauterine growth restriction reduces nephron number and renal excretory function in newborn piglets. *Acta Physiol Scand* 176:83-90, 2002
- [116] Edwards LJ, Coulter CL, Symonds ME, *et al.*: Prenatal undernutrition, glucocorticoids and the programming of adult hypertension. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 28:938-941, 2001
- [117] Roghair RD, Segar JL, Sharma RV, *et al.*: Newborn lamb coronary artery reactivity is programmed by early gestation dexamethasone before the onset of systemic hypertension. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 289:R1169-1176, 2005

- [118] Wintour EM, Moritz KM, Johnson K, *et al.*: Reduced nephron number in adult sheep, hypertensive as a result of prenatal glucocorticoid treatment. *J Physiol* 549:929-935, 2003
- [119] Madsen K, Stubbe J, Yang T, *et al.*: Low endogenous glucocorticoid allows induction of kidney cortical cyclooxygenase-2 during postnatal rat development. *Am J Physiol Renal Physiol* 286:F26-37, 2004
- [120] Frey FJ, Odermatt A, Frey BM: Glucocorticoid-mediated mineralocorticoid receptor activation and hypertension. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 13:451-458, 2004
- [121] Condon J, Gosden C, Gardener D, *et al.*: Expression of type 2 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase and corticosteroid hormone receptors in early human fetal life. *J Clin Endocrinol Metab* 83:4490-4497, 1998
- [122] Kaplan BS, Restaino I, Raval DS, *et al.*: Renal failure in the neonate associated with in utero exposure to non-steroidal anti-inflammatory agents. *Pediatr Nephrol* 8:700-704, 1994
- [123] van der Heijden BJ, Carlus C, Narcy F, *et al.*: Persistent anuria, neonatal death, and renal microcystic lesions after prenatal exposure to indomethacin. *Am J Obstet Gynecol* 171:617-623, 1994
- [124] Novy MJ: Effects of indomethacin on labor, fetal oxygenation, and fetal development in rhesus monkeys. *Adv Prostaglandin Thromboxane Res* 4:285-300, 1978
- [125] Norton ME, Merrill J, Cooper BA, *et al.*: Neonatal complications after the administration of indomethacin for preterm labor. *N Engl J Med* 329:1602-1607, 1993
- [126] Peruzzi L, Gianoglio B, Porcellini MG, *et al.*: Neonatal end-stage renal failure associated with maternal ingestion of cyclo-oxygenase-type-1 selective inhibitor nimesulide as tocolytic [letter; comment] [see comments]. *Lancet* 354:1615, 1999
- [127] Khan KN, Stanfield KM, Dannenberg A, *et al.*: Cyclooxygenase-2 expression in the developing human kidney. *Pediatr Dev Pathol* 4:461-466, 2001
- [128] Kömhoff M, Wang JL, Cheng HF, *et al.*: Cyclooxygenase-2-selective inhibitors impair glomerulogenesis and renal cortical development. *Kidney Int* 57:414-422, 2000
- [129] Langenbach R, Loftin C, Lee C, *et al.*: Cyclooxygenase knockout mice: models for elucidating isoform-specific functions. *Biochem Pharmacol* 58:1237-1246, 1999
- [130] Darby IA, Sernia C: In situ hybridization and immunohistochemistry of renal angiotensinogen in neonatal and adult rat kidneys. *Cell Tissue Res* 281:197-206, 1995
- [131] Gomez RA, Lynch KR, Sturgill BC, *et al.*: Distribution of renin mRNA and its protein in the developing kidney. *Am J Physiol* 257:F850-858, 1989
- [132] Jung FF, Bouyounes B, Barrio R, *et al.*: Angiotensin converting enzyme in renal ontogeny: hypothesis for multiple roles. *Pediatr Nephrol* 7:834-840, 1993
- [133] Norwood VF, Craig MR, Harris JM, *et al.*: Differential expression of angiotensin II receptors during early renal morphogenesis. *Am J Physiol* 272:R662-668, 1997
- [134] Aguilera G, Kapur S, Feuillan P, *et al.*: Developmental changes in angiotensin II receptor subtypes and AT1 receptor mRNA in rat kidney. *Kidney Int* 46:973-979, 1994
- [135] Grady EF, Sechi LA, Griffin CA, *et al.*: Expression of AT2 receptors in the developing rat fetus. *J Clin Invest* 88:921-933, 1991
- [136] Shanmugam S, Llorens-Cortes C, Clauser E, *et al.*: Expression of angiotensin II AT2 receptor mRNA during development of rat kidney and adrenal gland. *Am J Physiol* 268:F922-930, 1995
- [137] Siragy HM: AT1 and AT2 receptor in the kidney: role in health and disease. *Semin Nephrol* 24:93-100, 2004

- [138] Carey RM, Wang ZQ, Siragy HM: Role of the angiotensin type 2 receptor in the regulation of blood pressure and renal function. *Hypertension* 35:155-163, 2000
- [139] Nagata M, Tanimoto K, Fukamizu A, *et al.*: Nephrogenesis and renovascular development in angiotensinogen-deficient mice. *Lab Invest* 75:745-753, 1996
- [140] Tanimoto K, Sugiyama F, Goto Y, *et al.*: Angiotensinogen-deficient mice with hypotension. *J Biol Chem* 269:31334-31337, 1994
- [141] Yanai K, Saito T, Kakinuma Y, *et al.*: Renin-dependent cardiovascular functions and renin-independent blood-brain barrier functions revealed by renin-deficient mice. *J Biol Chem* 275:5-8, 2000
- [142] Niimura F, Labosky PA, Kakuchi J, *et al.*: Gene targeting in mice reveals a requirement for angiotensin in the development and maintenance of kidney morphology and growth factor regulation. *J Clin Invest* 96:2947-2954, 1995
- [143] Esther CR, Jr., Howard TE, Marino EM, *et al.*: Mice lacking angiotensin-converting enzyme have low blood pressure, renal pathology, and reduced male fertility. *Lab Invest* 74:953-965, 1996
- [144] Friberg P, Sundelin B, Bohman SO, *et al.*: Renin-angiotensin system in neonatal rats: induction of a renal abnormality in response to ACE inhibition or angiotensin II antagonism. *Kidney Int* 45:485-492, 1994
- [145] Tufro-McReddie A, Romano LM, Harris JM, *et al.*: Angiotensin II regulates nephrogenesis and renal vascular development. *Am J Physiol* 269:F110-115, 1995
- [146] McCausland JE, Bertram JF, Ryan GB, *et al.*: Glomerular number and size following chronic angiotensin II blockade in the postnatal rat. *Exp Nephrol* 5:201-209, 1997
- [147] Guron G, Sundelin B, Wickman A, *et al.*: Angiotensin-converting enzyme inhibition in piglets induces persistent renal abnormalities. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 25:88-91, 1998
- [148] Lasaitiene D, Chen Y, Guron G, *et al.*: Perturbed medullary tubulogenesis in neonatal rat exposed to renin-angiotensin system inhibition. *Nephrol Dial Transplant* 18:2534-2541, 2003
- [149] Gomez RA, Norwood VF: Developmental consequences of the renin-angiotensin system. *Am J Kidney Dis* 26:409-431, 1995
- [150] Chen Y, Lasaitiene D, Friberg P: The renin-angiotensin system in kidney development. *Acta Physiol Scand* 181:529-535, 2004
- [151] Cho H, Thorvaldsen JL, Chu Q, *et al.*: Akt1/PKB α is required for normal growth but dispensable for maintenance of glucose homeostasis in mice. *J Biol Chem* 276:38349-38352, 2001
- [152] Cho H, Mu J, Kim JK, *et al.*: Insulin resistance and a diabetes mellitus-like syndrome in mice lacking the protein kinase Akt2 (PKB β). *Science* 292:1728-1731, 2001
- [153] Chen WS, Xu PZ, Gottlob K, *et al.*: Growth retardation and increased apoptosis in mice with homozygous disruption of the Akt1 gene. *Genes Dev* 15:2203-2208, 2001
- [154] Testa JR, Bellacosa A: AKT plays a central role in tumorigenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:10983-10985, 2001
- [155] Liu AX, Testa JR, Hamilton TC, *et al.*: AKT2, a member of the protein kinase B family, is activated by growth factors, v-Ha-ras, and v-src through phosphatidylinositol 3-kinase in human ovarian epithelial cancer cells. *Cancer Res* 58:2973-2977, 1998
- [156] Franke TF, Yang SI, Chan TO, *et al.*: The protein kinase encoded by the Akt proto-oncogene is a target of the PDGF-activated phosphatidylinositol 3-kinase. *Cell* 81:727-736, 1995

- [157] Chan TO, Rittenhouse SE, Tschlis PN: AKT/PKB and other D3 phosphoinositide-regulated kinases: kinase activation by phosphoinositide-dependent phosphorylation. *Annu Rev Biochem* 68:965-1014, 1999
- [158] Yuan ZQ, Sun M, Feldman RI, *et al.*: Frequent activation of AKT2 and induction of apoptosis by inhibition of phosphoinositide-3-OH kinase/Akt pathway in human ovarian cancer. *Oncogene* 19:2324-2330, 2000
- [159] Altomare DA, Testa JR: Perturbations of the AKT signaling pathway in human cancer. *Oncogene* 24:7455-7464, 2005
- [160] Frame S, Cohen P: GSK3 takes centre stage more than 20 years after its discovery. *Biochem J* 359:1-16, 2001
- [161] Rubinfeld B, Albert I, Porfiri E, *et al.*: Binding of GSK3beta to the APC-beta-catenin complex and regulation of complex assembly. *Science* 272:1023-1026, 1996
- [162] Boyle WJ, Smeal T, Defize LH, *et al.*: Activation of protein kinase C decreases phosphorylation of c-Jun at sites that negatively regulate its DNA-binding activity. *Cell* 64:573-584, 1991
- [163] Manoukian AS, Woodgett JR: Role of glycogen synthase kinase-3 in cancer: regulation by Wnts and other signaling pathways. *Adv Cancer Res* 84:203-229, 2002
- [164] Galliher-Beckley AJ, Williams JG, Collins JB, *et al.*: Glycogen synthase kinase 3beta-mediated serine phosphorylation of the human glucocorticoid receptor redirects gene expression profiles. *Mol Cell Biol* 28:7309-7322, 2008
- [165] Salas TR, Reddy SA, Clifford JL, *et al.*: Alleviating the suppression of glycogen synthase kinase-3beta by Akt leads to the phosphorylation of cAMP-response element-binding protein and its transactivation in intact cell nuclei. *J Biol Chem* 278:41338-41346, 2003
- [166] Hoeflich KP, Luo J, Rubie EA, *et al.*: Requirement for glycogen synthase kinase-3beta in cell survival and NF-kappaB activation. *Nature* 406:86-90, 2000
- [167] Diehl JA, Cheng M, Roussel MF, *et al.*: Glycogen synthase kinase-3beta regulates cyclin D1 proteolysis and subcellular localization. *Genes Dev* 12:3499-3511, 1998
- [168] Takada Y, Fang X, Jamaluddin MS, *et al.*: Genetic deletion of glycogen synthase kinase-3beta abrogates activation of IkappaBalpha kinase, JNK, Akt, and p44/p42 MAPK but potentiates apoptosis induced by tumor necrosis factor. *J Biol Chem* 279:39541-39554, 2004
- [169] Rao R, Hao CM, Breyer MD: Hypertonic stress activates glycogen synthase kinase 3beta-mediated apoptosis of renal medullary interstitial cells, suppressing an NFkappaB-driven cyclooxygenase-2-dependent survival pathway. *J Biol Chem* 279:3949-3955, 2004
- [170] Rao R, Zhang MZ, Zhao M, *et al.*: Lithium treatment inhibits renal GSK-3 activity and promotes cyclooxygenase 2-dependent polyuria. *Am J Physiol Renal Physiol* 288:F642-649, 2005
- [171] Fujino H, West KA, Regan JW: Phosphorylation of glycogen synthase kinase-3 and stimulation of T-cell factor signaling following activation of EP2 and EP4 prostanoid receptors by prostaglandin E2. *J Biol Chem* 277:2614-2619, 2002
- [172] Fujino H, Xu W, Regan JW: Prostaglandin E2 induced functional expression of early growth response factor-1 by EP4, but not EP2, prostanoid receptors via the phosphatidylinositol 3-kinase and extracellular signal-regulated kinases. *J Biol Chem* 278:12151-12156, 2003
- [173] Fang X, Yu SX, Lu Y, *et al.*: Phosphorylation and inactivation of glycogen synthase kinase 3 by protein kinase A. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:11960-11965, 2000
- [174] Cross DA, Alessi DR, Cohen P, *et al.*: Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B. *Nature* 378:785-789, 1995

- [175] Meigs TE, Fields TA, McKee DD, *et al.*: Interaction of Galpha 12 and Galpha 13 with the cytoplasmic domain of cadherin provides a mechanism for beta -catenin release. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:519-524, 2001
- [176] Fujino H, Regan JW: FP prostanoid receptor activation of a T-cell factor/beta -catenin signaling pathway. *J Biol Chem* 276:12489-12492, 2001
- [177] Howe LR, Subbaramaiah K, Chung WJ, *et al.*: Transcriptional activation of cyclooxygenase-2 in Wnt-1-transformed mouse mammary epithelial cells. *Cancer Res* 59:1572-1577, 1999
- [178] Wong NA, Pignatelli M: Beta-catenin—a linchpin in colorectal carcinogenesis? *Am J Pathol* 160:389-401, 2002
- [179] Filippa N, Sable CL, Filloux C, *et al.*: Mechanism of protein kinase B activation by cyclic AMP-dependent protein kinase. *Mol Cell Biol* 19:4989-5000, 1999
- [180] Li M, Wang X, Meintzer MK, *et al.*: Cyclic AMP promotes neuronal survival by phosphorylation of glycogen synthase kinase 3beta. *Mol Cell Biol* 20:9356-9363, 2000
- [181] Klein, Chang, CHo: www.pharmgkb.org, in *Pharmacogenomics Knowledge Base*, Stanford University, 2001
- [182] Breitbart C: Korrektur postnataler Nierenreifungsstrungen bei der COX-2-negativen Maus, in, Phillips-Universität Marburg (Lahn), 2006
- [183] Herud A: Untersuchungen zur Cyclooxygenase-abhängigen Nephrogenese der Maus, in, Phillips-Universität Marburg(Lahn), 2008
- [184] Penning TD, Talley JJ, Bertenshaw SR, *et al.*: 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]benzene nesulfonamide (SC-58635, celecoxib). *J Med Chem* 40:1347-1365, 1997
- [185] Masferrer JL, Koki A, Seibert K: COX-2 inhibitors. A new class of antiangiogenic agents. *Ann N Y Acad Sci* 889:84-86., 1999
- [186] Kardosh A, Wang W, Uddin J, *et al.*: Dimethyl-celecoxib (DMC), a derivative of celecoxib that lacks cyclooxygenase-2-inhibitory function, potently mimics the anti-tumor effects of celecoxib on Burkitt's lymphoma in vitro and in vivo. *Cancer Biol Ther* 4:571-582, 2005
- [187] Narumiya S, FitzGerald GA: Genetic and pharmacological analysis of prostanoid receptor function. *J Clin Invest* 108:25-30, 2001
- [188] Pietrement C, Malot L, Santerne B, *et al.*: Neonatal acute renal failure secondary to maternal exposure to telmisartan, angiotensin II receptor antagonist. *J Perinatol* 23:254-255, 2003
- [189] Alwan S, Polifka JE, Friedman JM: Angiotensin II receptor antagonist treatment during pregnancy. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol* 73:123-130, 2005
- [190] Herold G, Mitarbeiter: *Innere Medizin*. Köln, 2008
- [191] Nagai N, Oike Y, Noda K, *et al.*: Suppression of ocular inflammation in endotoxin-induced uveitis by blocking the angiotensin II type 1 receptor. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 46:2925-2931, 2005
- [192] Rodriguez JA, Vio CP, Pedraza PL, *et al.*: Bradykinin regulates cyclooxygenase-2 in rat renal thick ascending limb cells. *Hypertension* 44:230-235, 2004
- [193] Wolf G: Angiotensin II and tubular development. *Nephrol Dial Transplant* 17 Suppl 9:48-51, 2002
- [194] Gross G, Imamura T, Vogt SK, *et al.*: Inhibition of cyclooxygenase-2 prevents inflammation-mediated preterm labor in the mouse. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 278:R1415-1423, 2000

- [195] King J, Flenady V, Cole S, *et al.*: Cyclo-oxygenase (COX) inhibitors for treating preterm labour. Cochrane Database Syst Rev:CD001992, 2005
- [196] Van den Veyver IB, Moise KJ, Jr.: Prostaglandin synthetase inhibitors in pregnancy. *Obstet Gynecol Surv* 48:493-502, 1993
- [197] Shah AA, Thjodleifsson B, Murray FE, *et al.*: Selective inhibition of COX-2 in humans is associated with less gastrointestinal injury: a comparison of nimesulide and naproxen. *Gut* 48:339-346, 2001
- [198] Itabashi K, Ohno T, Nishida H: Indomethacin responsiveness of patent ductus arteriosus and renal abnormalities in preterm infants treated with indomethacin. *J Pediatr* 143:203-207, 2003
- [199] Weintraub Z, Solovechick M, Reichman B, *et al.*: Effect of maternal tocolysis on the incidence of severe periventricular/intraventricular haemorrhage in very low birthweight infants. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 85:F13-17, 2001
- [200] Goldenberg RL, Davis RO, Baker RC: Indomethacin-induced oligohydramnios. *Am J Obstet Gynecol* 160:1196-1197, 1989
- [201] Peruzzi L, Gianoglio B, Porcellini G, *et al.*: [Neonatal chronic kidney failure associated with cyclo-oxygenase-2 inhibitors administered during pregnancy]. *Minerva Urol Nefrol* 53:113-116, 2001
- [202] Cuzzolin L, Dal Cere M, Fanos V: NSAID-induced nephrotoxicity from the fetus to the child. *Drug Saf* 24:9-18, 2001
- [203] Robin YM, Reynaud P, Orliaguet T, *et al.*: Renal tubular dysgenesis-like lesions and hypocalvaria. Report of two cases involving indomethacin. *Pathol Res Pract* 196:791-794, 2000
- [204] Ostensen M: Nonsteroidal anti-inflammatory drugs during pregnancy. *Scand J Rheumatol Suppl* 107:128-132, 1998
- [205] Stubbe J, Madsen K, Nielsen FT, *et al.*: Glucocorticoid impairs growth of kidney outer medulla and accelerates loop of Henle differentiation and urinary concentrating capacity in rat development. *Am J Physiol Renal Physiol* 291:F812-F822, 2006
- [206] Cheng HF, Harris RC: Renal effects of non-steroidal anti-inflammatory drugs and selective cyclooxygenase-2 inhibitors. *Curr Pharm Des* 11:1795-1804, 2005
- [207] Whelton A, Lefkowitz JL, West CR, *et al.*: Cardiorenal effects of celecoxib as compared with the nonsteroidal anti-inflammatory drugs diclofenac and ibuprofen. *Kidney Int* 70(8):1495-502, 2006
- [208] Liu Y, Goor Hv, Havinga R, *et al.*: Neonatal dexamethasone administration cause progressive renal damage due to induction of early inflammatory response. *Am J Physiol Renal Physiol* 294:F768-F776, 2008
- [209] Daikha-Damane F, Levy-Beff E, Jugie M, *et al.*: Foetal kidney maldevelopment in maternal use of angiotensin II type 1 receptor antagonists. *Pediatr Nephrol* 21: 729-732, 2006
- [210] Kuure S, Popsueva A, Jakobson M, *et al.*: Glycogen synthase kinase-3 inactivation and stabilization of beta-catenin induce nephron differentiation in isolated mouse and rat kidney mesenchymes. *J Am Soc Nephrol* 18:1130-1139, 2007
- [211] Sugawara M, Hashimoto K, Ota Z: Involvement of prostaglandin E2, cAMP, and vasopressin in lithium-induced polyuria. *Am J Physiol* 254:R863-869, 1988
- [212] Rogatsky I, Waase CL, Garabedian MJ: Phosphorylation and inhibition of rat glucocorticoid receptor transcriptional activation by glycogen synthase kinase-3 (GSK-3). Species-specific differences between human and rat glucocorticoid receptor signaling as revealed through GSK-3 phosphorylation. *J Biol Chem* 273:14315-14321, 1998

- [213] Aggarwal BB: Signalling pathways of the TNF superfamily: a double-edged sword. *Nat Rev Immunol* 3:745-756, 2003
- [214] Schwabe RF, Brenner DA: Role of glycogen synthase kinase-3 in TNF-alpha-induced NF-kappaB activation and apoptosis in hepatocytes. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 283:G204-211, 2002

Anhang

Abkürzungsverzeichnis

AA	Arachidonsäure
Abb.	Abbildung
Abk.	Abkürzung
abs.	absolut
ACE	Angiotensin converting enzyme
ad	auf
ADAPT	Alzheimer's Disease Anti-inflammatory Prevention Trial
ANP	Atrial natriuretisches Peptid
APC	Adenoma Prevention with Celecoxib Trial
APPROVe	Adenomatous Polyp Prevention on VIOXX Trial
APS	Ammoniumpersulfat
ASS	Acetylsalicylsäure
AT II	Angiotensin II
AT1 bzw. AT2	Angiotensin II-Rezeptor, Subtyp 1 bzw. 2
ATP	Adenosintriphosphat
AUC	Area under the curve
BCA	bicinchoninic acid
bp	Basenpaare (base pair)
BSA	Rinderserum-Albumin (Bovine Serum Albumin)
CABG	Coronary Arterie Bypass graft trial
cAMP	Cyclisches Adenosinmonophosphat
cDNA	copy DNA
CLASS	Celecoxib Long-term Arthritis Safety Study
COX	Cyclooxygenase
C_T	Zyklus-Schwellenwert (Cycle threshold)
Da	Dalton

ddH ₂ O	Zweifach entionisiertes Wasser
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	2'-Desoxyribonukleosid-5'-Triphosphate
DP	Prostaglandin D2-Rezeptor
DTT	Dithiothreit
EDTA	Ethylendiamin-Tetraessigsäure
EGF	Epidermal growth factor
EMEA	European Medicine Agency
entspr.	entspricht
EP1-4	Prostaglandin E2-Rezeptor, Subtypen 1-4
<i>et al.</i>	und andere (<i>et alii</i>)
EtOH	Ethanol
evtl.	eventuell
FAP	Familiäre adenomatöse Polyposis
FP	Prostaglandin F _{2α} -Rezeptor
<i>g</i>	Erdbeschleunigung, $g = 9,81 \text{ m/s}^2$
GFR	Glomeruläre Filtrationsrate
GPCR	G-Protein gekoppelter Rezeptor, G-protein-coupled receptor
GSK-3β	Glykogen-Synthase-Kinase-3β
HE	Hämatoxylin-Eosin
HWZ	Halbwertszeit
i.p.	intra peritoneal
IgG	Immunglobulin G
IHC	Immunhistochemie
IL	Interleukin
iNOS	Induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase
IP	Prostacyclin-Rezeptor
IP ₃	Inositoltriphosphat
IVC	Individually ventilated cages
kb	Kilobasenpaare
KG	Körpergewicht
ld	limb deformity, Formin
LPS	Lipopolysaccharid
M	Molarität (mol/L)

MEDAL	Multinational Etoricoxib and Diclofenac Arthritis Long-Term trial
mRNA	Messenger RNA
NF κ B	Nuklearfaktor kappa B
NO	Stickstoffmonoxid
NSAIDs	Non-steroidal anti-inflammatory Drugs
OA	Osteoarthrose
PBS	Physiologischer Phosphatpuffer (Phosphate Buffered Saline)
PCNA	Proliferating Cell Nuclear Antigen
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction)
PDGF	Platelets Derived growth Factor
PG	Prostaglandin
PGD ₂	PGD ₂ , Prostaglandin D ₂
PGE ₂	PGE ₂ , Prostaglandin E ₂
PGF _{2α}	PGF _{2α} , Prostaglandin F _{2α}
PGI ₂	PGI ₂ , Prostacyclin
pH	pH-Wert (pondus hydrogenii)
Phe	Phenylalanin
PI3K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PKA	Proteinkinase A
PLA ₂	Phospholipase A ₂
Primer F bzw R	Primer Forward bzw. Reverse
PROCAM	Prospective Cardiovascular Münster
RA	Rheumatoide Arthritis
RBF	Renaler Blutfluss
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	rounds per minute
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Real time-PCR
s.c.	sub cutan
SDS	Natriumlaurylsulfat (sodiumdodecylsulfat)
SEM	Standardfehler des Mittelwerts (Standard Error of the Mean)
SSW	Schwangerschaftswoche
TAE	Tris-Essigsäure-EDTA
Taq	Thermus aquaticus
TARGET	Therapeutic Arthritis Research and Gastrointestinal Event Trial
TEMED	N,N,N,N'-Tetramethylethyldiamin

TGF- β	Transformationsfaktor β (Transforming tumor Growth Factor beta)
TNF	Tumornekrosefaktor
TP	Thromboxan-Rezeptor
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
TXA ₂	Thromboxan A ₂
Tyr	Tyrosin
U	Einheit (Unit)
u.a.	unter anderem
UV	Ultraviolette elektromagnetische Strahlung
vgl.	vergleiche
VIGOR	VIOXX Gastrointestinal Outcome Research Study
vs.	versus
z.B.	Zum Beispiel

Publikationen

Popp L, Häussler A, Olliges A, Nüsing R M, Narumiya S, Geisslinger G, Tegeder I.; *Comparison of nociceptive behavior in prostaglandin E, F, D, prostacyclin and thromboxane receptor knockout mice*, Eur J Pain. 2008 Oct 18

Olliges A, Wimmer S, Nüsing R M; *Effects of cyclooxygenase-2 specific inhibitors on nephrogenesis*, in Arbeit

Wimmer S, Olliges A, Nüsing R M; *Time dependent role of cyclooxygenase-2 in renal development of the mouse*, in Arbeit

Danksagung

Bedanken möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Rolf Michael Nüsing für die Bereitstellung des Arbeitsthemas, die Ideen und die Betreuung meiner Doktorarbeit, sowie die geduldige Beantwortung meiner Fragen und die Umsetzung meiner eigenen Ideen.

Bei Herrn Prof. Dr. Dr. Gerd Geißlinger und dem Institut für klinische Pharmakologie möchte ich mich für die Bereitstellung des Laborarbeitsplatzes und der damit verbundenen „Hardware“ bedanken. Bei allen Kollegen aus dem vierten Stock möchte ich mich für die Beantwortung der vielen Fragen und die guten Tipps bedanken. Besonderer Dank gilt Lars Zulauf, der mir bei den ersten Schritten mit den Western Blots geholfen hat, Julia Metzner, die mir die TaqMan-Primer zur Verfügung gestellt hat, Ivonne Wobst, die mir bei der TaqMan-Auswertung geholfen hat, Annett Häussler, Laura Popp und Ovidiu Coste, die mir im Tierstall einiges gezeigt haben. Bedanken möchte ich mich auch bei Vanessa Bockhart, Hilmar Kühlein, Christine Möser, Achim Schmidtke, Antje Treude, und bei denen, die ich jetzt vergessen habe, sie lassen mich die Laborzeit in guter Erinnerung behalten, waren immer für ein Gespräch bereit und natürlich für die Abende im „Kanonensteppel“ und auf dem Grillplatz in Oberrad. Bei Wiebke Becker und Christian Brenneis möchte ich mich bedanken für die Bereitstellung einiger Antikörper und Tipps für Western Blots und Immunhistochemie. Besonderer Dank gilt auch der Tierpflegerin Frau Dostewitz, die mir im Tierstall immer mit Rat und Tat zur Seite stand vor allem bei Fragen zur Zuchtplanung, sowie Herrn Theisen, Frau Tandi und allen Mitarbeitern der zentralen Forschungseinrichtung (ZFE). Bedanken möchte ich mich ebenfalls bei den Labormitarbeitern der „alten“ Kinderklinik in Marburg, vor allem bei Anika Schuster für die Hilfe am Anfang.

Ein ganz besonderer Dank gebührt meinem Freund Helge, der mich immer unterstützt hat und Verständnis hatte, wenn ich wochenlang jeden Morgen Tiere gespritzt habe und mich schließlich auch fachlich beraten hat.

Die abschließenden Dankworte gelten meiner lieben Familie, meinen Eltern, die es mir ermöglicht haben, ohne Sorgen zu studieren und mich jederzeit unterstützt haben und meinen Geschwistern Sven, Lars und Inga, die mich durch ihre eigenen Studiengänge ermuntert und inspiriert haben. Lieber Hermann und Sven, danke für das kritische Korrekturlesen der Arbeit.

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre, daß ich die dem Fachbereich Medizin der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main zur Promotionsprüfung eingereichte Dissertation mit dem Titel

„DIE WIRKUNG VON CYCLOOXYGENASE-2-INHIBITOREN AUF DIE NEPHROGENESE
VON MÄUSEN“

in dem Institut für klinische Pharmakologie, Klinikum der Johann Wolfgang Goethe-Universität unter Betreuung und Anleitung von Prof. Dr. Rolf Michael Nüsing ohne sonstige Hilfe und selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation genannten Hilfsmittel benutzt habe. Ich habe bisher an keiner in- und ausländischen Universität ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht. Die vorliegende Arbeit wurde bisher nicht als Dissertation eingereicht.

Anke Olliges, Frankfurt am Main, 2. September 2009