

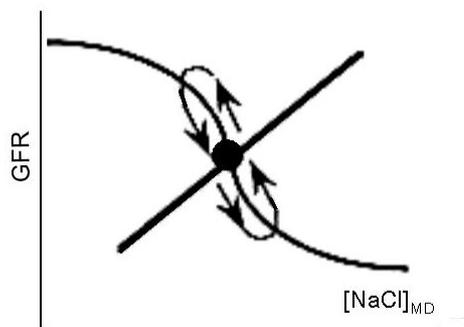
# 1 Einleitung

## 1.1 Physiologie der Harnbildung

Die exkretorische Funktion der Säugetiere ist durch zwei grundlegende Prinzipien gekennzeichnet: Die glomeruläre Filtration und die anschließende Bearbeitung des Filtrates durch Resorptions- und Sekretionsvorgänge. Durch den Prozess der glomerulären Filtration werden ca. 20% (beim Menschen 120 ml/min) des durch die Niere fließenden Blutplasmas in den Harnraum abgeschieden. Im Anschluss daran erfolgt in einem energieverbrauchenden Prozess die Rückresorption von 99% des ursprünglichen Filtrates. Diese Methode der Urinproduktion erfordert, dass pro Tag ca. 1,5 kg Kochsalz (NaCl) und 180 l Wasser filtriert und wieder zurückresorbiert werden [1]. Dabei muss die letztendlich ausgeschiedene Kochsalzmenge exakt der mit der Nahrung aufgenommenen Menge entsprechen. Angesichts der bei diesem Vorgang bewegten Volumina und Substanzmengen wird deutlich, dass eine exakte Koordination von glomerulärer Filtrationsrate (GFR) und Reabsorptionskapazität des Nephrons die Grundvoraussetzung für eine effiziente Arbeit der Niere ist [2, 3].

Von herausragender Bedeutung für diese Koordination ist der juxtaglomeruläre Apparat der Niere. Dieser besteht aus der afferenten und der efferenten Arteriole, dem extraglomerulären Mesangium und der Macula densa. Als Macula densa wird dabei eine Subpopulation von TAL Epithelzellen bezeichnet, die sich sowohl morphologisch als auch funktionell von den umliegenden TAL-Zellen unterscheidet. Die Macula densa liegt in direkter Nachbarschaft zum Gefäßpol des Glomerulum und bildet somit einen direkten Kontakt zwischen den glomerulären Gefäßen und dem aus dem Glomerulum hervorgehenden Tubulussystem. Der JGA befindet sich an der Grenze zwischen dem proximalen und distalen Nephron. An dieser Stelle erreicht die NaCl Konzentration der Tubulusflüssigkeit durch selektive Reabsorptionsvorgänge in den vorangegangenen Nephronabschnitten ein Minimum und unterliegt starken Schwankungen. Der JGA ist daher ideal positioniert um Änderungen der NaCl Konzentration in der Tubulusflüssigkeit vor Eintritt in das distale Nephron zu

messen. In einem als tubuloglomerulärer Rückkopplungs- oder Feedbackmechanismus (TGF) bezeichneten Prozess erfolgt hier durch eine selektive Beeinflussung des Tonus der afferenten Arteriole eine Anpassungen der GFR [2, 4]. Dabei führen kurzfristige Schwankungen in der NaCl Konzentration der Tubulusflüssigkeit an der Macula densa zu reziproken Veränderungen der GFR des einzelnen Nephrons (SNGFR). Die Intensität der TGF Antwort ist im physiologischen Bereich proportional zur Salzkonzentration, und die Effizienz des Mechanismus sinkt erst bei extremen Abweichungen ab. Die TGF Antwort wird üblicherweise als Arbeitskurve beschrieben, wobei die SNGFR in Abhängigkeit vom NaCl Gehalt der Tubulusflüssigkeit an der Macula densa dargestellt wird (Abbildung 1). Die TGF-Antwort erfolgt innerhalb von Sekunden und kann die SNGFR um bis zu 70% variieren [5]



**Abbildung 1:** Arbeitskurve des tubuloglomerulären Rückkopplungsmechanismus. Dargestellt ist der Arbeitspunkt bei einer gegebenen NaCl Konzentration mit der zugehörigen SNGFR. Abweichungen dieser Konzentration führen zu definierten gegenläufigen Änderungen der SNGFR durch die die NaCl Konzentration wieder zum Arbeitspunkt zurückgebracht wird. Im Equilibrium führen minimale Schwankungen der Filtration und die konsekutiven Änderungen der SNGFR zu einer Oszillation um den Arbeitspunkt (reflektiert durch die Pfeile). Durch diesen Mechanismus wird die Zufuhr von Soluten in den distalen Teil des Nephrons in engen Grenzen konstant gehalten (Grafik aus [5]).

## 1.2 Regulatorische Enzymsysteme im JGA

Die an der Ausbildung der TGF-Antwort beteiligten vasoaktiven Substanzen können, ihrer Funktion entsprechend, in 2 Gruppen eingeteilt werden. Dabei gibt es eine Mediators substanz, welche ursächlich für die Entstehung der TGF-Antwort verantwortlich ist und mehrere Modulators substanz die die Intensität der bestehenden Antwort verändern [6]. Nach anfänglichen Kontroversen ist die Funktion von Adenosin als Mediator des TGF inzwischen experimentell belegt und allgemein akzeptiert [7, 8, 9, 10]. Adenosin wird entweder direkt aus ATP oder aus dessen Abbauprodukten im Interstitium des JGA gebildet. Dadurch ist die

Konzentration von Adenosin direkt proportional zum Energieverbrauch der Macula densa-Zellen und wird durch den Salztransport determiniert. Die TGF Antwort entsteht durch eine Vasokonstriktion der afferenten Arteriole, welche durch die Bindung von Adenosin an Adenosinrezeptoren vom Typ 1A ausgelöst wird.

Durch die kombinierte Wirkung verschiedener Modulatoren wird die Intensität der TGF Antwort beeinflusst und die Arbeitskurve in horizontaler Richtung verschoben sowie in ihrer Steilheit variiert. Dieser als temporale Adaptation bezeichnete Vorgang ermöglicht die Anpassung der TGF Antwort an längerfristige Veränderungen des Volumenstatus des extrazellulären Raumes und der renalen Perfusion. Die temporale Adaptation wird durch eine veränderte Expression verschiedener Enzymsysteme im JGA vermittelt und erfolgt innerhalb von 60 Minuten [7, 11]. Zu den für diesen Vorgang wichtigen Enzymsystemen gehören das L-Arginin-NO System und das Arachidonsäure-Prostaglandinsystem sowie das durch beide beeinflusste Renin-Angiotensin-Aldosteronsystem (RAAS) [7]. Da die Interaktionsmechanismen zwischen diesen Enzymsystemen Gegenstand der vorliegenden Arbeit sind, sollen die einzelnen Enzyme und Ihre Funktionen in den folgenden Abschnitten dargestellt werden.

### *1.2.1 Das Renin-Angiotensin-Aldosteronsystem*

Eine der wichtigsten Funktionen des JGA besteht in der Steuerung der Ausschüttung von Renin, dem Geschwindigkeits-bestimmenden Enzym des Renin-Angiotensin-Aldosteronsystems. Renin wird in den granulären Zellen der afferenten Arteriole gebildet und über verschiedene Stimuli in die Zirkulation freigesetzt [12, 13]. Hier katalysiert das Enzym den ersten Schritt einer Reaktionskaskade, in deren Folge Angiotensin II (Ang II) entsteht. Ang II ist das Effektorpeptid des RAAS. Es vermittelt seine unterschiedlichen Wirkungen über eine Bindung an spezifische Rezeptoren in den Zielorganen. Einige wichtige Effekte von Ang II sind in Abbildung 2 aufgelistet.

Die Regulation der Freisetzung von Renin erfolgt sowohl auf der Ebene der Expression als auch auf der Ebene der Exkretion. Einen hemmenden Einfluss auf beide Prozesse haben dabei u.a. Ang II , Endothelin, Adenosin und Arginin-Vasopressin [16, 17, 18, 19, 20, 21]. Weiterhin besteht im Rahmen des

Barorezeptorreflexes eine inverse Korrelation zwischen arteriellem Blutdruck und der Freisetzung von Renin [22, 23]. Eine stimulierende Wirkung auf die Expression und Exkretion von Renin haben Dopamin, Glukagon und *Calcitonin gene-related peptide* [24, 25, 26, 27]. Auch eine Aktivierung adrenerger  $\beta 1$  Rezeptoren am JGA löst eine akute Steigerung der Sekretion und mRNA Synthese von Renin aus.

<p>AT1 Rezeptor</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Vasokonstriktion und Steigerung des arteriellen Blutdrucks</li> <li>• Regulation der GFR</li> <li>• Steigerung der tubulären Natriumreabsorption</li> <li>• Steigerung des Sympathikotonus über zentrale und periphere Mechanismen</li> <li>• Steigerung der Synthese und Freisetzung von Aldosteron aus der Nebenniere</li> <li>• Wachstumsfördernde Effekte (Proliferation und Hyperplasie)</li> <li>• Stimulation der Synthese und Hemmung des Abbaus extrazellulärer Matrix</li> <li>• Proinflammatorische Wirkung über Induktion von Chemokinen und Aktivierung von <math>\text{NF}\kappa\text{B}</math>, MCP-1 und Osteopontin</li> <li>• Induktion von Sauerstoffradikalbildung u.a. über eine Stimulation der NADPH Oxidase</li> </ul>
<p>AT2 Rezeptor</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Vasodilatation</li> <li>• Freisetzung von NO und Bradykinin</li> <li>• Wachstumshemmende Effekte (Induktion von Apoptose)</li> <li>• Gewebedifferenzierung</li> <li>• Hemmung des AT1 Rezeptors</li> </ul>

**Abbildung 2:** Wichtige biologische Effekte von Angiotensin II und verantwortliche Rezeptoren (nach [14] und [15]).

Von besonderer Bedeutung für die vorliegende Arbeit ist die parakrine Regulation der Produktion und Freisetzung von Renin durch den Macula densa-Mechanismus. Durch diesen Mechanismus ist die Freisetzung von Renin invers an die Salzkonzentration der Tubulusflüssigkeit an der Macula densa gekoppelt. Ein anhaltender Abfall der NaCl Konzentration an der Macula densa hat also eine vermehrte Freisetzung von Renin zur Folge. Die daraus resultierende Steigerung der Ang II Spiegel führt entweder direkt oder über eine Stimulation der

Freisetzung von Aldosteron aus den Nebennieren zu einer Steigerung der renalen NaCl Reabsorption. Durch eine systemische Vasokonstriktion kommt es zu einem Anstieg des Blutdrucks, und über einen zentralen Mechanismus wird die Salz- und Wasseraufnahme gesteigert. Dies führt zu einem Ausgleich des Volumenstatus und damit zu einer Normalisierung der GFR. Eine Steigerung der Salzkonzentration der Tubulusflüssigkeit an der Macula densa ist mit entgegengesetzten Vorgängen verbunden. Wie auch bei der Entstehung der temporalen Adaptation der TGF Antwort sind an diesem Prozess Prostaglandine und NO beteiligt.

### *1.2.2 Das L-Arginin-NO System*

Stickstoffmonoxid (NO) spielt eine wichtige Rolle bei einer Vielzahl physiologischer und pathologischer Prozesse. Die Bildung von NO aus L-Arginin wird durch spezifische NO Synthasen katalysiert, von denen zur Zeit drei Isoformen bekannt sind. Diese wurden entsprechend der Reihenfolge ihrer Entdeckung NOS1-3 genannt. NOS1 wird wegen seiner Expression im Gehirn auch neuronale NOS genannt, das Enzym wird aber auch in verschiedenen anderen Organen einschließlich der Nieren exprimiert. Im JGA findet sich NOS1 in den Zellen der Macula densa, wo die Expression wiederum invers mit der Salzkonzentration der Tubulusflüssigkeit an dieser Stelle korreliert ist [13]. NOS2 gilt als induzierbares Enzym und ist maßgeblich an der Immunantwort von Phagozyten beteiligt [28]. Bei den physiologischen Regulationsvorgängen im JGA spielt dieses Enzym aber vermutlich keine Rolle. Die dritte NOS-Isoform wird ebenfalls konstitutiv exprimiert und wegen ihrer Expression in Endothelzellen auch eNOS genannt. In der Niere wird eNOS im Endothel der renalen Gefäße [29] und im TAL exprimiert [30], wobei die Existenz einer NOS3-Expression im TAL jedoch nicht von allen Autoren akzeptiert wird [29].

Die Wirkung von NO am JGA führt zu einer Rechtsverschiebung der TGF-Arbeitskurve und zu einer verminderten Intensität der TGF-Antwort. Der Mechanismus dieses Effektes ist nicht genau bekannt.

Über die Funktion von NO bei der Regulation der Freisetzung und Expression von Renin gibt es in der Literatur widersprüchliche Ansichten, wobei jedoch die Mehrzahl der Studien auf eine stimulierende Wirkung hinweist. Eine Steigerung der Renin-Expression könnte dabei über eine Stimulation der Aktivität der

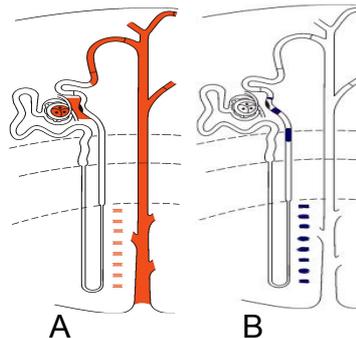
löslichen Guanylatzyklase vermittelt werden, während eine hemmende Wirkung über den cGMP/cGMP Kinase Weg erklärbar wäre [31, 32]. Vermutlich bestimmt dabei die Summe aus inhibitorischer und stimulatorischer Wirkung den Nettoeffekt von NO auf die Sekretion von Renin [31].

### 1.2.3 Das Arachidonsäure-Prostaglandinsystem

Prostanoide sind zyklische, oxygenierte Derivate der Arachidonsäure [33, 34] und können entsprechend ihrer Struktur in Prostaglandine (PGD, PGE1 und 2, PGF, PGI) und Thromboxane (TXA, TXB) eingeteilt werden. Individuelle Prostanoide werden dabei entweder durch spezifische Synthesen aus Vorstufen gebildet oder isomerisieren spontan ohne weitere Enzymbeteiligung. Das Geschwindigkeitsbegrenzende Enzym dieser Kaskade ist dabei in jedem Fall eine Prostaglandin G2/H2 Synthase oder Cyclooxygenase (COX). Im Moment sind zwei Isoformen der Cyclooxygenase (COX-1 und COX-2) bekannt [35, 36]. Über die Existenz einer dritten Isoform (COX-3) wird spekuliert [37]. COX-1 wird außer im Herz und im Gehirn nahezu überall konstitutiv exprimiert und hat vermutlich „housekeeping“-Funktionen [38]. In der Niere von Ratten wird COX-1 im Endothel renaler Gefäße, im glomerulären Mesangium, im medullären Teil der dicken aufsteigenden Henle Schleife sowie in kortikalen und medullären Sammelrohren exprimiert [39, 40].

COX-2 wurde zuerst als Zytokin- und Wachstumsfaktor-induzierbares Enzym beschrieben und spielt eine wichtige Rolle bei entzündlichen Vorgängen [41]. Später konnte gezeigt werden, dass COX-2 in verschiedenen Organen des Urogenitaltraktes und im Gehirn auch konstitutiv exprimiert wird [41, 42, 43]. In der Niere findet sich COX-2 in einzelnen Zellen des dicken Teils der aufsteigenden Henle Schleife, in der Macula densa und in interstitiellen Zellen des Nierenmarks [40, 44]. In der Macula densa und im TAL ist auch die Expression von COX-2 invers mit der Salzkonzentration der Tubulusflüssigkeit verbunden. Das wichtigste Prostaglandin im JGA ist Prostaglandin E [45, 46]. Dieses wird vor allem in Situationen mit eingeschränkter renaler Perfusion, wie z.B. bei kongestiver Herzinsuffizienz, Exsikkose oder einer Nierenarterienstenose in Abhängigkeit von COX-2 gebildet. In diesen Situationen bewirkt PGE eine Dilatation der afferenten Arteriole und moduliert damit die TGF Antwort [47, 48, 49]. In den glomerulären Gefäßen werden außerdem, abhängig von COX-1,

Prostaglandin I und Thromboxan A gebildet. Prostaglandin I puffert die durch Ang II verursachte Kontraktion der afferenten Arteriole [50, 51]. Das vasokonstriktorisch wirkende Thromboxan A vermindert den renalen Blutfluss und senkt die GFR [52]. PGE und PGI bewirken außerdem eine Steigerung der Expression und der Freisetzung von Renin [51, 53, 54]. Dieser Effekt ist ebenfalls unter Bedingungen einer eingeschränkten renalen Perfusion bzw. niedrigen NaCl Konzentrationen der Tubulusflüssigkeit an der Macula densa besonders ausgeprägt.



**Abbildung 3:** Schematische Darstellung der Expression von COX-1 in rot (A) und COX-2 in blau (B) in der Niere von Ratten (adaptiert aus [40]).

#### 1.2.4 Regulation der JGA-assoziierten Expression von NOS1, COX-2 und Renin

Eine Anzahl von Studien zeigt eine parallele Regulation von NOS1, COX-2 und Renin unter verschiedenen experimentellen Bedingungen. Einige dieser Studien sind in Tabelle 1 zusammengestellt.

Kondition	Expression von		
	COX-2	NOS1	Renin
Salzreiches Futter	vermindert [55]	vermindert [13, 56, 57]	vermindert [13, 56, 58]
Salzarmes Futter	gesteigert [55] [59]	gesteigert [13, 56, 60]	gesteigert [13, 56, 61]
AT1 Blockade / ACE Inhibition	gesteigert [62]	gesteigert [62] [63]	gesteigert [62] [64]
2K1C, clip	gesteigert [65, 66]	gesteigert [13, 67]	gesteigert [68, 69]
2K1C, non-clip	vermindert [70]	vermindert [13, 71]	vermindert [72, 73]
Blockade von NKCC2	gesteigert [74]	gesteigert [13, 75]	gesteigert [13] [76]
Subtotale Nierenresektion	gesteigert [77], [78]	vermindert [79]	gesteigert [80]

Fawn hooded hypertensive rat (FHH)	gesteigert [81]	gesteigert [81]	gesteigert [81]
spontan hypertensive Ratte (SHR)	unbekannt	gesteigert [82]	vermindert [83]

**Tabelle 1:** Vergleichende Gegenüberstellung des Expressionsverhaltens von NOS1, COX-2 und Renin unter verschiedenen experimentellen Bedingungen

Aufgrund der parallelen Regulation von COX-2 und NOS1 im JGA unter verschiedenen Bedingungen und der Ähnlichkeit der physiologischen Wirkung wurde über eine Interaktion beider Produkte spekuliert. Beispiele fanden sich z.B. in Modellen stimulierter phagozytierender Zellen. In diesen Zellen steht die Induktion von NOS2 am Anfang einer Kaskade, in der durch COX-2 gebildete Prostaglandine die Endstrecke der inflammatorischen Antwort bilden. Dabei steigert NO hier je nach Modell Expression und/oder Aktivität von COX-2 (Übersicht in [84]).

Die zum Thema der Interaktion zwischen L-Arginin-NO- und Cyclooxygenase-Prostaglandinsystem im JGA publizierten Studien kommen allerdings zu widersprüchlichen Ergebnissen [85, 86, 87, 88, 89]. Ursachen für die uneinheitlichen Resultate könnten die Verwendung verschiedener Techniken für die Messung der COX-2-Expression oder Unterschiede in der Spezifität der verwendeten pharmakologisch aktiven Substanzen sein. Weiterhin besteht die Möglichkeit, dass in der Niere unterschiedliche Schwellenwerte der lokalen NO-Konzentration für die Stimulation von Expression bzw. Enzymaktivität von COX-2 bestehen. Eine Möglichkeit zur Vermeidung der Spezifitätsprobleme von Inhibitoren besteht in der Verwendung genetisch manipulierter Mäuse mit NOS1- bzw. COX-2-Defizienz. Dabei ist allerdings zu beachten, dass über die physiologische Regulation des RAAS in der Maus wenig bekannt ist und dass deutliche Unterschiede zu anderen Tiermodelle bestehen. Auch die Regulation der Expression von NOS1 und COX-2 im JGA von Mäusen ist experimentell wenig untersucht.

NOS1-defiziente Mäuse sind lebensfähig, fruchtbar und normotensiv [90]. Die Tiere weisen eine erhöhte Ruhe-Herzfrequenz bei verminderter Frequenzvariabilität und eine vermehrte kardiale Kontraktilität auf [91, 92]. Die basale Renin-Plasmaaktivität (PRA) ist vermindert, die Stimulation der Renin-

Freisetzung durch Blockade des NKCC2 jedoch erhalten [93]. Auch die TGF Antwort ist in den Tieren normal [90, 94, 95].

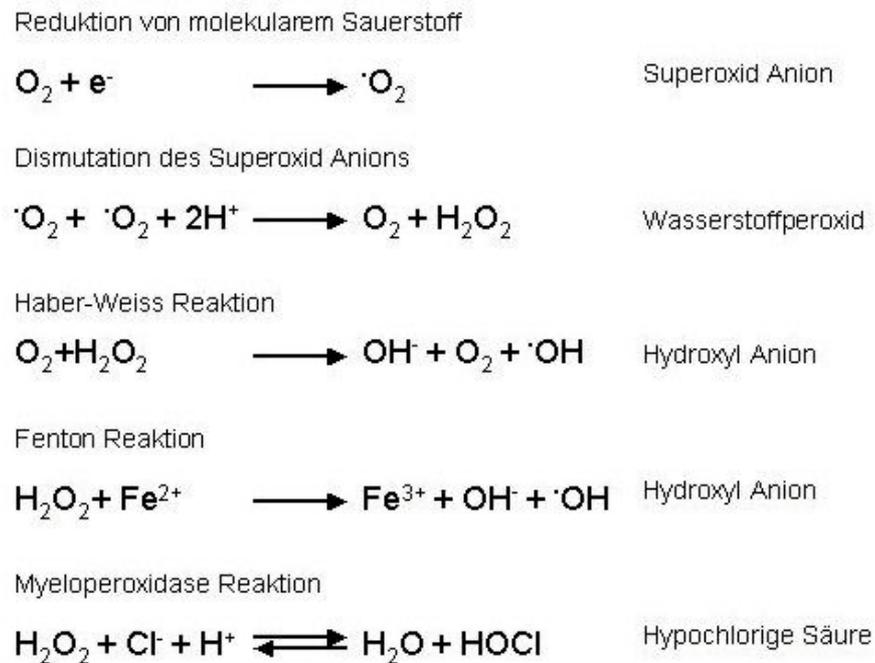
COX-2-defiziente Mäuse zeigen ebenfalls eine verminderte PRA [96]. Die Salzabhängigkeit der Expression und Ausschüttung von Renin ist erhalten [97]. Dagegen führt die Behandlung der Tiere mit einem ACE Hemmer nicht zu einer signifikanten Steigerung der Expression von Renin [96]. Bei der Interpretation dieser Resultate muss berücksichtigt werden, dass die Nieren der COX-2-defizienten Mäuse eine erhebliche Wachstums- und Reifungsstörung aufweisen. Sie sind kleiner und weisen insgesamt weniger Glomeruli als die Nieren der altersentsprechenden Kontrollgruppe auf. Von dieser Entwicklungsstörung ist vor allen Dingen der subkapsuläre Teil des renalen Kortex betroffen. Hier findet sich auch bei erwachsenen Tieren ein unreifes Parenchym, die Glomeruli sind klein und zeigen einen unreifen Phänotyp. Im Gegensatz dazu erscheinen die Glomeruli der tieferen Schichten erheblich vergrößert [98, 99, 100]. Die glomeruläre Hypertrophie wurde im Sinne einer Kompensation für die unterentwickelte subkapsuläre Nierenregion interpretiert. Die normale GFR der jungen erwachsenen Tiere weist ebenfalls auf kompensatorische Vorgänge hin. Die Mechanismen, die zur Entwicklung einer Nephronhypertrophie führen, sind nicht vollständig geklärt. Untersuchungen an Tiermodellen mit einer chronischen Nierenschädigung weisen aber auf eine Beteiligung von vasodilatatorischen Prostaglandinen hin [101, 102, 103, 104]. Glomeruläre Hypertrophie und Hyperfiltration gelten als Risikofaktoren für die Entwicklung einer chronischen Niereninsuffizienz und Glomerulosklerose [102, 105]. Auch an diesen Prozessen sind Prostaglandine ursächlich beteiligt [103]. COX-2-defiziente Mäuse stellen daher ein in mehrfacher Hinsicht interessantes Tiermodell dar. So bietet sich durch die Untersuchung der Regulationsvorgänge am JGA die Möglichkeit Einblicke in die Interaktionsmechanismen der verschiedenen Enzymsysteme an dieser Stelle zu gewinnen. Weiterhin stellt sich aufgrund der erheblichen Nephronhypertrophie die Frage nach dem Mechanismus, durch den Hyperfiltration und Hypertrophie auch in Abwesenheit von COX-2 erzeugt und aufrechterhalten werden. Durch eine Langzeitbeobachtung der Tiere sind außerdem Einblicke in die Pathogenese der Glomerulosklerose zu erwarten.

### 1.3 Rolle reaktiver Sauerstoffspezies bei der Regulation des JGA

Reaktive Sauerstoffspezies (ROS) spielen eine entscheidende Rolle bei physiologischen Vorgängen wie der Immunabwehr, der Messung der Sauerstoffspannung in Geweben, der Regulation des Gefäßtonus und der Homöostase der arteriellen Gefäßwand [106, 107, 108]. Eine vermehrte lokale Produktion oder ein Versagen der antioxidativen Schutzsysteme kann jedoch zu einer unkontrollierten Oxidation körpereigener Substanzen führen. Dieser Vorgang wird als oxidativer Stress bezeichnet und spielt eine wichtige Rolle bei Alterungsprozessen sowie bei der Entstehung von Malignomen und der arteriellen Hypertonie [28, 109, 110, 111]. Oxidativer Stress bleibt durch die hohe Reaktivität und die damit verbundene geringe Halbwertszeit der beteiligten Moleküle ein lokal begrenzt wirksames Phänomen [112].

ROS entstehen über den aeroben Metabolismus oder als Haupt- bzw. Nebenprodukte anderer enzymatisch gesteuerter Reaktionen. Zu den verantwortlichen Enzymen gehören NO Synthasen, COX-Isoformen, Xanthin Oxidase sowie die NADPH Oxidase phagozytierender Zellen [112, 113]. Die NADPH Oxidase ist in verschiedenen Tier- und Zellmodellen als Quelle für oxidativen Stress und die damit verbundenen pathologischen Prozesse identifiziert worden [114, 115, 116, 117]. ROS entfalten ihre Wirkung über eine direkte Stimulation redox-sensitiver Cytokine und Transkriptionsfaktoren wie z.B. NF $\kappa$ B oder TNF $\alpha$ . Ein weiterer Mechanismus der Wirkung von ROS beruht auf der Interaktion mit körpereigenen Molekülen. So bewirken sie z.B. über eine nichtenzymatische Oxidation von Arachidonsäure die Bildung von Isoprostanen. Diese bewirken eine Konstriktion und Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen sowie eine Thrombozytenaggregation [118]. Weiterhin führt die Reaktion von ROS mit Tyrosinresten im katalytischen Zentrum von COX-2 zu einer Inhibition der Enzymaktivität und damit zu einer verminderten Bildung vasodilatierender Prostaglandine [119]. Ein weiteres wichtiges Beispiel für die Reaktion von ROS mit körpereigenen Molekülen ist die Elimination von NO. Superoxid reagiert mit NO zu Peroxynitrit. Dabei ist die Geschwindigkeitskonstante dieser Reaktion größer als die der Entgiftung von Superoxid durch Superoxid Dismutase oder die der Reaktion von NO mit Häm-Verbindungen. Dies hat zur Folge, dass, solange beide Radikale in einem System vorhanden sind, die Reaktion zu Peroxynitrit

bevorzugt abläuft und die Bioverfügbarkeit von NO dadurch vermindert wird. Peroxynitrit ist außerdem eines der stärksten bekannten Oxidantien und reagiert nach seiner Bildung entweder direkt mit Proteinen, Lipiden oder Nukleinsäuren oder dient als Ausgangssubstanz für eine Reihe weiterer potenter Oxidantien [112, 120].



**Abbildung 4:** Wichtige Stoffwechselwege in der Entstehung und im Abbau von Sauerstoffradikalen. In der rechten Spalte wurden die Hauptprodukte der jeweiligen Reaktion angegeben [112].

Ein Modell zum Studium der Effekte erhöhter Sauerstoffradikal-Konzentrationen am JGA ist die spontan hypertensive Ratte (SHR) [121]. SHR gelten als Modell für eine hereditäre Form der salzabhängigen essentiellen Hypertonie. Als renaler Phänotyp weisen die Tiere eine gesteigerte Aktivität des TGF und eine verminderte Gesamt-GFR auf. Diese Veränderungen sind vermutlich an der initialen Salzretention und der Ausbildung der Hypertonie beteiligt. Gemeinsame Ursache für diese renalen Phänomene ist eventuell eine verminderte Wirkung von NO. Diese ist nicht auf eine verminderte Bildung der Substanz zurückzuführen, da die Expression von NOS1 in der Macula densa gesteigert ist. Auch ein Mangel an Kofaktoren besteht nicht [82, 122]. Als Erklärung für diese Resultate wird von verschiedenen Autoren eine Elimination von NO durch Reaktion mit Superoxid angeführt. Für das Bestehen von oxidativem Stress sprechen auch die vermehrte

Ausscheidung von Isoprostanen [123] und die antihypertensive Wirkung einer chronischen Gabe von Antioxidantien [123, 124, 125, 126].

Ausgehend von der Beobachtung einer gesteigerten Expression von NADPH Oxidase-Untereinheiten in der Macula densa von SHR formulierten Welch et al. [127] die Hypothese, dass die erhöhte Sauerstoffradikalbildung in den SHR durch eine vermehrte lokale Produktion von NADPH Oxidase hervorgerufen wird und dass diese ursächlich an der Entwicklung der arteriellen Hypertonie beteiligt ist. Einen direkten experimentellen Beweis für die Beteiligung der NADPH Oxidase an den Sauerstoffradikal-assoziierten Effekten am JGA gibt es bis jetzt jedoch nicht.

Die am besten charakterisierte NADPH Oxidase-Isoform ist die der neutrophilen Granulozyten. Dieses Enzym besteht aus den zytosolischen Komponenten p47phox, p67phox und Rac1 bzw. 2 und einem Membran-assoziierten Cytochrom b558. Dieses besteht wiederum aus p22phox und dem glykosylierten gp91phox [113]. Nach Stimulation der NADPH Oxidase kommt es durch eine Komplexbildung der zytosolischen und membrangebundenen Komponenten [128] zur Bildung des aktiven Enzymkomplexes. NADPH Oxidase katalysiert die Reduktion von molekularem Sauerstoff zum Superoxidanion ( $\cdot\text{O}_2^-$ ) [113].

Ein Ansatzpunkt zur Inhibition der NADPH Oxidase-Funktion besteht daher in der pharmakologischen Hemmung der Bildung des Enzymkomplexes durch Apocynin (4'-hydroxy-3'-methoxy-acetophenon). Diese Substanz wurde erstmalig 1883 von Schmiedeberg und später erneut von Finne more aus der Wurzel des Indianischen Hanfes (*Apocynum cannabinum*) isoliert [129, 130]. Finne more konnte außerdem zeigen, dass es sich bei Apocynin und dem 1891 von Otto synthetisierten Acetovanillon um die gleiche Substanz handelte [130, 131]. Zur Zeit der Entdeckung von Apocynin wurden Extrakte des indianischen Hanfes zur Behandlung verschiedener Herz- und Nierenerkrankungen sowie der rheumatoiden Arthritis verwendet [132]. Eine Renaissance erfuhr Apocynin, nachdem es 1971 von Basu als pharmakologisch wirksamer Bestandteil der Wurzel der orientalischen Arzneipflanze *Picrorhiza kurroa* isoliert wurde [133]. 1990 konnte dann von Simons und Kollegen gezeigt werden, dass Apocynin an essentielle Thiolgruppen der zytosolischen Untereinheiten des Enzyms bindet und

damit die Zusammensetzung des funktionierenden NADPH Oxidase Komplex verhindert.



**Abbildung 5:** Indianischer Hanf (**A**) wächst in den westlichen Teilen Nordamerikas. Auszüge aus den Wurzeln der Pflanzen wurden zur Therapie von Herz- und Nierenerkrankungen verwendet. Picrohiza kurroa (**B**) ist ein orientalisches Heilkraut und kommt in den alpinen Regionen des Himalaja vor. Die Einheimischen nennen die Pflanze Katuka oder Kutki und verwenden Auszüge zur Therapie verschiedenster Erkrankungen. Ein pharmakologisch wirksamer Bestandteil beider Pflanzen ist Apocynin (**C**) ([www.himalayahealthcare.com](http://www.himalayahealthcare.com) und [www.flavornet.org](http://www.flavornet.org), [132])