

Aus dem Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Universität  
Tübingen

Abteilung Pharmakologie und experimentelle Therapie

Ärztlicher Direktor: Professor Dr. H. Oßwald

**Theophyllin zur Prävention und Behandlung des  
Ischämie-/Reperfusionsschadens nach  
Nierentransplantation an der Ratte**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin

der Medizinischen Fakultät  
der Eberhard-Karls-Universität  
zu Tübingen

vorgelegt von  
Hans-Detlef Baier  
aus  
Rupea / Rumänien  
2007

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter: Professor Dr. H. Oßwald

2. Berichterstatter: Professor Dr. T. Risler

Meinen Eltern

# Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung.....	1
1.1 Die Nierentransplantation.....	1
1.2 Adenosin.....	6
1.3 Adenosinwirkung an der Niere.....	7
1.4 Der Ischämie- / Reperfusionsschaden.....	9
1.5 Theophyllin.....	13
1.5.1 Adenosinrezeptorantagonismus .....	14
1.5.2 Hemmung der Phosphodiesterasen.....	14
1.5.3 Kalziummobilisation .....	15
1.5.4 Theophyllin und akutes Nierenversagen.....	15
1.6 Studienziel .....	19
2. Material und Methoden .....	20
2.1 Versuchstiere.....	20
2.2 Technik der Nierentransplantation .....	20
2.2.1 Hilfsmittel .....	20
2.2.2 Explantation .....	21
2.2.3 Transplantation .....	23
2.3 Inulin-Clearance .....	26
2.3.1 Narkose .....	26
2.3.2 Präparation.....	26
2.3.3 Clearance.....	28
2.4 Versuchsgruppen.....	29
2.5 Vorversuche zu Dosierung und Wechselwirkungen.....	30
2.6 Pathohistologische Auswertung.....	32
2.7 Immunhistochemie .....	32
2.8 Zytokinkonzentrationen im Serum.....	33
2.9 Adenosinrezeptor (AdoR) - mRNA-Expression in der Niere .....	33
2.10 Analysen und Berechnungen .....	35
2.11 Statistische Auswertung.....	35
3. Ergebnisse .....	36
3.1 Transplantatfunktion.....	36

3.2 Zytokinkonzentrationen im Serum.....	40
3.3 Histologische Untersuchungen .....	42
3.4 Immunhistochemische Analysen .....	43
3.5 Adenosinrezeptor (AdoR) mRNA Expression im Nierengewebe.....	44
4. Diskussion.....	45
4.1 Methode / CsA- und Theophyllinspiegel.....	45
4.2 Transplantatfunktion.....	46
4.3 Nierenhistologie und Zytokinkonzentrationen .....	47
4.4 Renale Adenosinrezeptor mRNA.....	48
5. Zusammenfassung und Schlußfolgerung .....	50
6. Literaturverzeichnis.....	52
7. Abkürzungen .....	65
8. Publikationen und Vorträge .....	68
Wissenschaftliche Originalarbeiten in referierten Journalen .....	68
Zitierbare wissenschaftliche Abstracts.....	68
Wissenschaftliche Vorträge.....	69
9. Danksagung .....	70
10. Lebenslauf .....	71

## 1. Einleitung

### 1.1 Die Nierentransplantation

Die Idee, Organe oder Organteile zur Heilung von Krankheiten zu transplantieren übte auf die Menschheit seit jeher große Faszination aus. In zahlreichen Sagen, Mythen und Legenden ist von Transplantationen die Rede und es gibt Aufzeichnungen, die bis ins Jahr 500 v. Chr. zurückreichen, in denen beschrieben wird, wie der berühmte chinesische Arzt Pien Ch'iao die Herzen zweier Patienten ausgetauscht hat, deren „Äquilibrium“ gestört war [63]. Die Legende von Cosmas und Damian, den beiden Schutzheiligen der Medizin, aus dem 3. Jahrhundert n. Chr. erzählt von einem Missionar, der sein Bein verloren hatte und dem ein gesundes Bein transplantiert wurde [125]. Nach ersten wissenschaftlichen Versuchen im 17. und 18. Jahrhundert, zerstörte menschliche Haut durch Gewebe von Tieren zu ersetzen, gelang dem Chirurgen Emerich Ullmann erstmals 1902 in Wien eine technisch erfolgreiche Nierentransplantation beim Hund [33, 137], die Versuche scheiterten jedoch an einer raschen Thrombose des Spenderorgans. Erst die Verbesserung der Gefäßnaht durch Alexis Carrel 1905, wofür er 1912 den Nobelpreis erhielt, beseitigte das Haupthindernis aus chirurgisch-technischer Sicht. 1936 wurde die erste Nierentransplantation beim Menschen von dem Ukrainischen Chirurgen Voronoy in Kiew durchgeführt, diese scheiterte jedoch an der nicht zu beeinflussenden Gewebeunverträglichkeit [127].

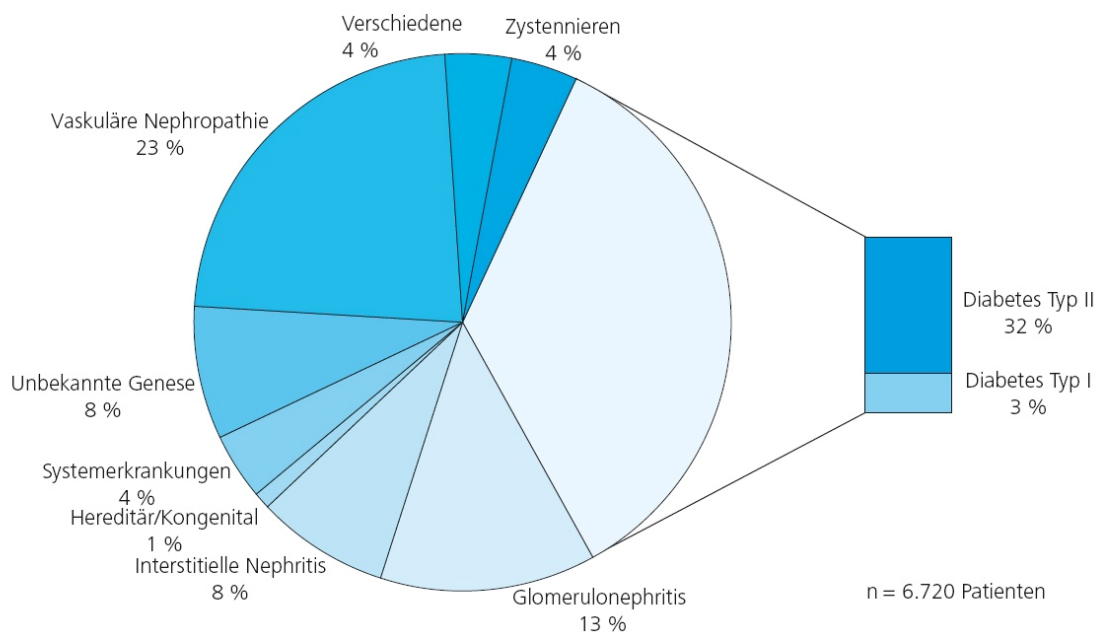
Einen Meilenstein in der Entwicklung der Transplantationsmedizin stellte die erste erfolgreiche Nierentransplantation zwischen eineiigen Zwillingen dar, die 1954 in Boston durch J. Murray und J. Merrill durchgeführt wurde [86]. Dieser klinische Erfolg belegte, dass die genetische Kompatibilität für das Überleben des Transplantates essentiell war, es folgten viele grundlegende Arbeiten auf dem Gebiet der Immunologie. Zunächst erfolgte die Beschreibung des Azathioprins durch Elion und Hutchings [36], die Entdeckung des

immunsuppressiven Potentials durch Schwartz, Stack und Damashek [123] und die Einführung in die klinische Transplantationsmedizin durch Murray und Calne [25, 87]. Kurze Zeit später beschrieb Starzl die supportive Wirkung des Prednisolons im Rahmen der Azathioprintherapie [126]. Eine weitere Verbesserung der immunsuppressiven Therapie stellte die Entdeckung des Cyclosporin A (CsA) 1970 durch Borel et al. dar, das 1978 erstmals durch Calne und Powels bei Patienten nach Nierentransplantation angewendet wurde [19, 20]. Heute findet CsA, dessen immunsuppressive Wirkung auf der Blockade der Transkription des Interleukin-2-Gens in T-Lymphozyten beruht, routinemäßig Anwendung bei Nierentransplantationen. Ein ähnliches, seit den späten 1980iger Jahren hinzugekommenes Präparat stellt Tacrolimus dar, ebenfalls ein Calcineurin-Inhibitor. Neue Immunsuppressiva, wie die IL-2-Rezeptorantikörper Daclizumab und Basiliximab werden zur Behandlung akuter Abstossungsreaktionen eingesetzt, die in Deutschland erst seit kurzem zugelassenen Proliferationshemmer, deren Wirkungsmechanismus auf der Blockade des Zellzyklus durch Blockade des mTOR (mammalian Target Of Rapamycine) - Rezeptors beruht, Sirolimus und Everolimus, stellen Möglichkeiten dar, die Abstossungsrate weiter zu senken. In Kombinationstherapie mit Cyclosporin sind für Sirolimus Rejektionsraten von <10% beobachtet worden [64].

Die Nierentransplantation ist heute ein Standardverfahren zur Nierenersatztherapie bei terminalem Nierenversagen, sie gilt als bestmögliche Therapieoption, da gezeigt werden konnte, dass eine erfolgreiche Transplantation Morbidität und Mortalität senkt und einen im Vergleich zur Dialysebehandlung in jeder Altersgruppe signifikanten Überlebensvorteil aufweist [144]. Die 5-Jahres-Überlebensrate von nierentransplantierten Patienten ist mit 81% deutlich höher als die der von einer Nierenersatzbehandlung abhängigen Patienten mit 63%.

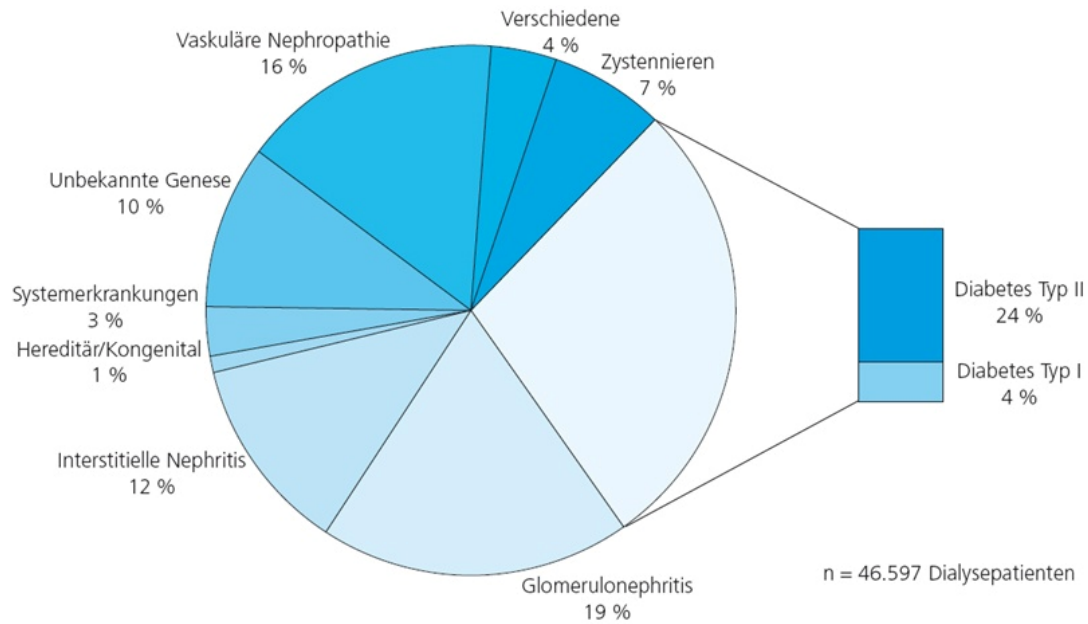
Die häufigste Ursache der terminalen Niereninsuffizienz ist die diabetische Nephropathie mit einem Anteil von ca. 35% der Patienten, bei denen eine Nierenersatztherapie begonnen werden musste. Weitere 23% entstehen durch

schlecht eingestellte arterielle Hypertonie (vaskuläre Nephropathie) 13 % durch Glomerulonephritiden. Andere Ursachen sind die interstitielle Nephritis mit 8%, Zystennieren mit 4%, Systemerkrankungen mit 4% sowie hereditäre/kongenitale Ursachen mit 1%. Bei 12% der Patienten mit neu aufgetretener terminaler Niereninsuffizienz bleibt die Ursache unklar (Abb. 1 und 2).



**Abb. 1:** Diagnoseverteilung der Patienten bei Therapiebeginn (Inzidenz) im Jahr 2005 (Jahresbericht QuaSi Niere 2005/2006)





**Abb. 2:** Diagnoseverteilung aller bei QuaSi-Niere erfassten lebenden Dialysepatienten in Nierenersatztherapie (Prävalenz) im Jahr 2005 (Jahresbericht QuaSi Niere 2005/2006)

2006 wurden in Deutschland 2076 Kadavernieren transplantiert, weitere 187 Nieren wurden in Kombination mit anderen Organen transplantiert. Demgegenüber steht ein ungleich höherer Bedarf, zum 31.12.2006 befanden sich allein in Deutschland 8242 Patienten auf der Warteliste für eine Nierentransplantation, weitere 231 Patienten benötigen neben einer Spenderniere weitere Organe (Eurotransplant, Jahresbericht 2006). Dieses seit Jahren bestehende, erhebliche Missverhältnis zwischen Spenderorganen und potentiellen Empfängern (Abb. 3-5) macht deutlich, dass alle Anstrengungen unternommen werden müssen, um ein möglichst langes Überleben der vorhandenen Spenderorgane zu gewährleisten.

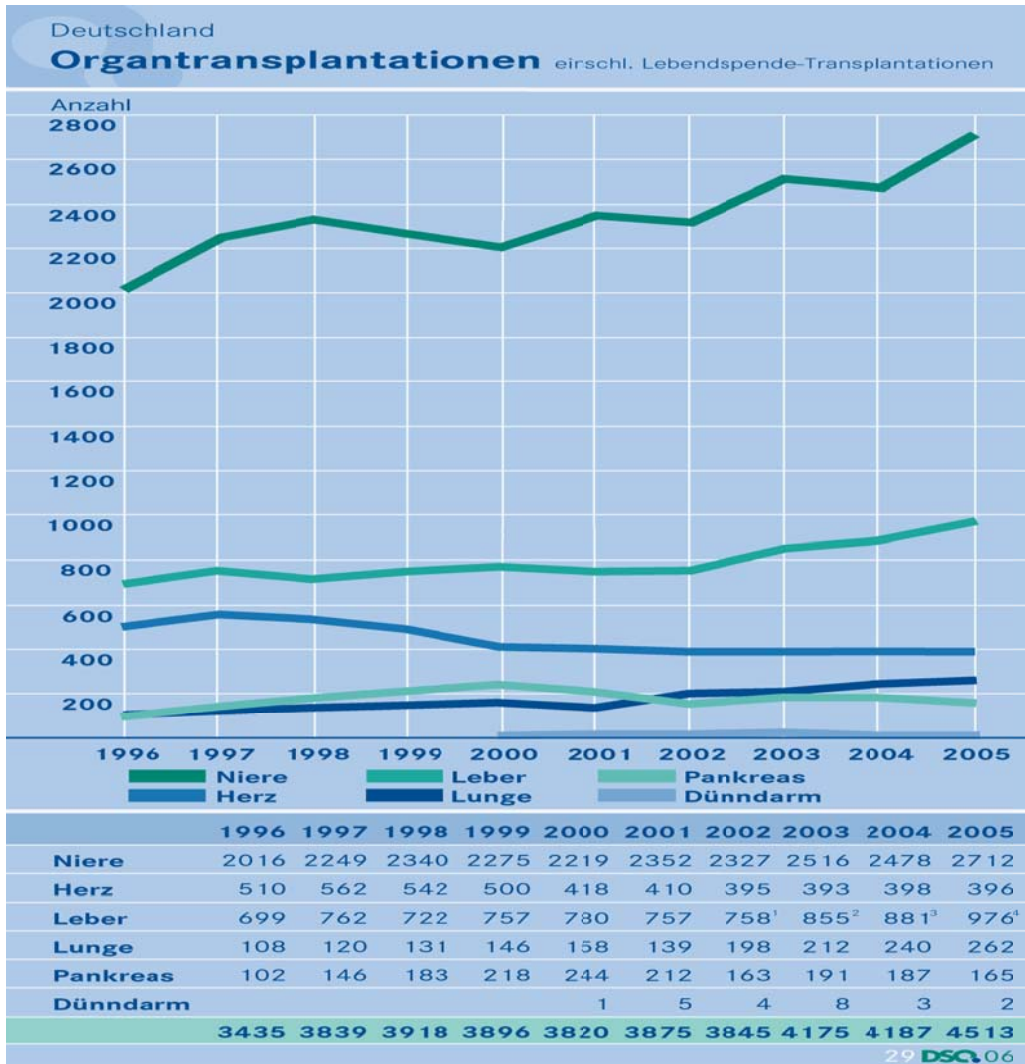


Abb. 3: Organtransplantationen in Deutschland 1996 – 2005 (Deutsche Stiftung Organtransplantation)

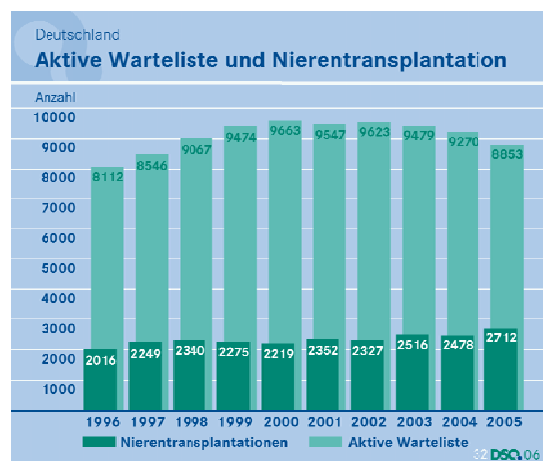
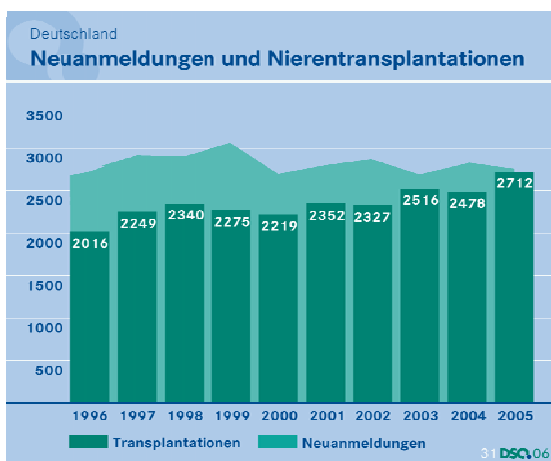
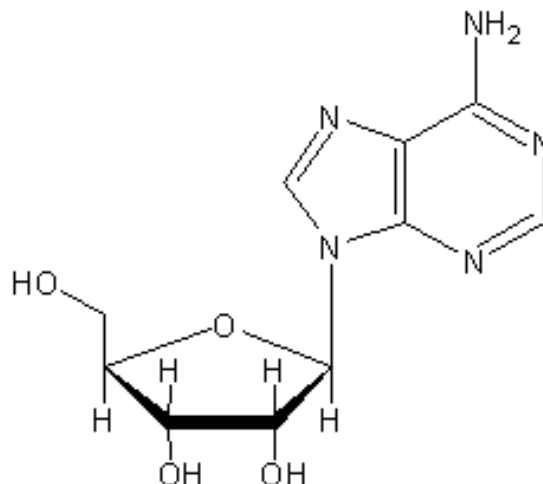


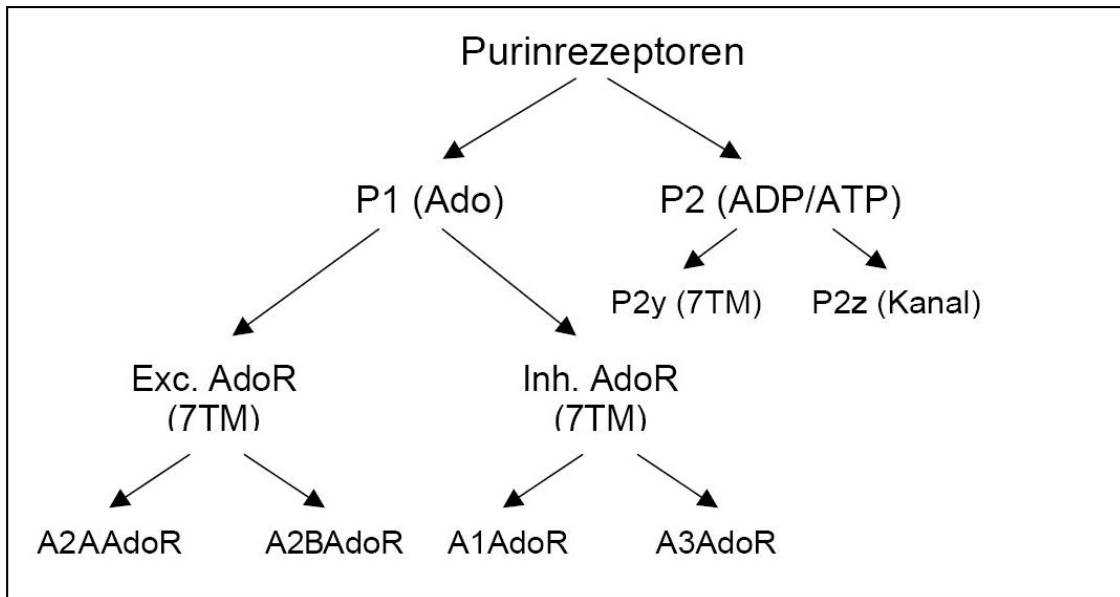
Abb. 4 und 5: Nierentransplantationen im Vergleich zu Neuanmeldungen pro Jahr und gesamter Warteliste 1996-2005 (Deutsche Stiftung Organtransplantation)

## 1.2 Adenosin

Adenosin (Abb. 6) ist ein Nukleosid mit Molmasse 267,242 und entsteht intrazellulär hauptsächlich durch Hydrolyse von Adenosin-5-Monophosphat, gesteuert durch das Enzym 5-Nukleotidase. Einmal durch Nukleosidtransporter ins Interstitium gelang, kann Adenosin mit seiner kurzen Halbwertszeit von 3-5 Sekunden als Gewebehormon wirken [11], sein Abbau erfolgt durch Desaminierung in Inosin. Extrazellulär wird Adenosin durch 5-Ectonuclease aus AMP und durch Ecto-Phosphodiesterase aus cAMP gebildet. Extrazelluläres Adenosin bindet an spezifische Adenosin-Membranrezeptoren des Purin-Typs (Abb. 7) [42, 112], die sich in verschiedene Rezeptortypen unterscheiden lassen, die sich in der Signaltransduktion unterscheiden [44]. Eine weitere Möglichkeit der Adenosinbildung ist die Hydrolyse von S-Adenylnhomocystein (SAH) in Adenosin und Homocystein. Bei Normoxie ist ca. 30% des intrazellulären Adenosins durch die SAH-Hydrolase in der NADH-Form gebunden, bei Ischämie hat das Enzym in der reduzierten NAD-Form eine um den Faktor 3-4 erniedrigte Bindungskapazität für Adenosin, es kommt zur Freisetzung von Adenosin [68].



**Abb. 6:** Strukturformel des Adenosins



**Abb. 7:** Einteilung der Purinrezeptoren.

Man unterscheidet 2 Familien der Nukleosid-Rezeptoren (P1), die Adenosin (Ado) als Substrat haben, und die relativ heterogene Familie der Nukleotidrezeptoren, deren Liganden Nukleosiddi- oder Triphosphate sind (P2). Letztgenannte Gruppe enthält unter anderem ATP-regulierte Ionenkanäle (P2z) oder NDP-spezifische G-Protein-gekoppelte 7-Transmembrandomänen-Rezeptoren (P2y). Ado-Rezeptoren werden unterteilt in die G<sub>s</sub>-gekoppelten, exzitatorischen A2AdoR (A2AAdoR; A2BAdoR) und die G<sub>i</sub>-gekoppelten, Adenylylcyclase-inhibierenden AdoR (A1AdoR, A3AdoR) [75]

### 1.3 Adenosinwirkung an der Niere

Die meisten Organe reagieren bei Belastung und damit erhöhtem Sauerstoff- und ATP-Verbrauch mit einer präkapillären Vasodilatation. Somit kommt es zu einer reaktiven Hyperämie, es resultiert ein erhöhtes Sauerstoff- und Substratangebot zur Energiegewinnung [122]. Im Gegensatz hierzu reagiert die Niere mit einer Vasokonstriktion auf ischämische Bedingungen [100]. Es kommt zu einer Reduktion der glomerulären Filtrationsrate und damit des Energieverbrauchs der Niere, eine weitere Verminderung des ATP/ADP-Quotienten wird verhindert. Adenosin wirkt in der Niere somit als endogener Mediator einer negativen Rückkopplung. Gestützt wird diese Annahme weiterhin durch die Beobachtung des Anstiegs des Adenosingehalts bei

Ischämie im Tierversuch an Ratten und Hunden [50, 67, 100]. Injiziert man Adenosin arteriell, kann man eine kurze Zeit später einsetzende, wenige Sekunden andauernde Reduktion der Nierendurchblutung beobachten. Diese Wirkung kann durch Theophyllin, einen unselektiven Adenosinantagonisten, in Konzentrationen von 20-50 $\mu$ M antagonisiert werden [92]. Die Hemmung der Adenosinwirkung erfolgte deutlich unterhalb der Schwellenkonzentration für eine Phosphodiesterasehemmung von 0,1-0,2mM [114, 115].

In Versuchen von Agmon et al. mit selektiven AdoRA1-Agonisten konnte gezeigt werden, dass die Reduktion der Nierendurchblutung vor allem durch AdoRA1-vermittelte Vasokonstriktion des Vas afferens bedingt war [1]. Diese Beobachtung konnte durch Pflüger et al. bestätigt werden [110].

Nicht nur exogen zugeführtes Adenosin, sondern auch endogenes Adenosin kann in einer Konzentration vorliegen, die vasokonstriktorisch wirksam ist. Bei Untersuchungen an Ratten konnte ein Adenosingehalt der Niere in Konzentrationen von 5-10nmol/g Feuchtgewicht nachgewiesen werden [50, 67, 98, 100, 117]. Bei zunehmender Dauer der Ischämie durch Okklusion der Nierenarterie (10-60 Sekunden) kann ein bis zu 6fach erhöhter Adenosingehalt des Nierengewebes nachgewiesen werden [67, 83, 100].

1977 wurde erstmals ein zunächst als „postokklusive Ischämie“ bezeichnetes Phänomen beobachtet. Hierbei zeigte sich, dass der renale Blutfluss unmittelbar nach Öffnen der Nierenarterie nach 30 Sekunden Ischämiezeit deutlich vermindert ist und erst nach 10-20 Sekunden wieder auf den Ausgangswert ansteigt [100]. Dieses Phänomen wurde der, durch die Ischämie ausgelösten, ansteigenden Adenosinkonzentration zugeschrieben und später als „postokklusive Reduktion des renalen Blutflusses“ (Postocclusive Reduction Of Renal Blood Flow, POR) benannt [110] und konnte mehrfach durch Arbeiten bestätigt werden, in denen Re-uptake-Inhibitoren von Adenosin, wie z.B. Dipyridamol, gegeben wurde [93, 120]. Eine Hemmung des POR konnte durch den unselektiven Adenosinrezeptorantagonisten Theophyllin [93, 100], wie auch durch den selektiven AdoRA1-Antagonisten DPCPX [109, 110] erzielt werden und damit gezeigt werden, dass die POR AdoRA1-vermittelt ist.

### 1.4 Der Ischämie- / Reperfusionsschaden

Neben chirurgischen Komplikationen und der Transplantatabstossung ist der Ischämie- und Reperfusionsschaden ein weiterer Faktor, der Ursache einer verzögerten Funktionsaufnahme bis hin zum initialen Transplantatversagen sein kann [7]. Eine verzögerte initiale Funktionsaufnahme des Transplantates aufgrund eines Ischämie-/ Reperfusionsschadens hat eine erhöhte Inzidenz eines chronischen Transplantatversagens zur Folge, vor allem bei zeitgleichem Auftreten von akuten Abstossungsreaktionen in der frühen Posttransplantationsphase [121, 136].

Jedes vaskularisierte Organtransplantat ist ein mehr oder weniger ischämisch geschädigtes und reperfundiertes Organ. Die Gesamtschämiezeit setzt sich zusammen aus der initialen warmen Ischämiezeit, der anschliessenden kalten Ischämiezeit während der Perfusion des Organs mit Konservierungslösung und Transport sowie der zur Reanastomosierung und Reperfusion benötigten warmen Ischämiezeit. Insbesondere während der warmen Ischämiezeit sind eine zunehmende Gewebeschädigung sowie ein Abfall des ATP-Gehaltes im Gewebe zu beobachten. Unter der Vorstellung, dass genügend Adenosin zur ATP-Resynthese während der Reperfusion zur Verfügung steht, wurde der University of Wisconsin (UW)- Lösung 5mM Adenosin beigefügt [8]. Die Verwendung der UW-Lösung hat dazu beigetragen, auch bei längerer kalter Ischämiezeit gute Transplantatfunktionen zu erreichen [124]. Die Zusammensetzung der UW-Lösung basiert auf dem Verständnis von Organschäden und –schutzmechanismen und wurde durch ausführliche Analyse von grundlegenden Prinzipien von organspezifischem Metabolismus und Ischämie unter hypothermen, anaeroben Bedingungen erarbeitet (Tabelle 1).

**Tab. 1:** Zusammensetzung der UW-Lösung, die bei Zimmertemperatur mit Hilfe von NaOH auf einen pH-Wert von 7.4 gebracht wird

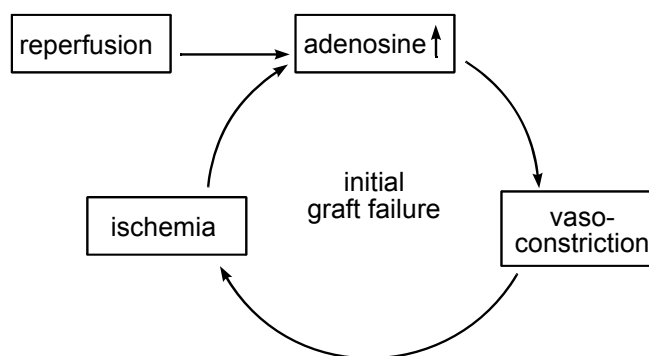
Substance	Amount in one liter	Rational
K+-lactobionate	100 mmol	Barrier
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	25 mmol	Buffer
MgSO <sub>4</sub>	5 mmol	Membrane stabilization
Raffinose	30 mmol	Oncotic support
Adenosine	5 mmol	ATP precursor
Glutathione	3 mmol	Scavenger
Allopurinol	1 mmol	Xanthin oxide inhibitor
Hydroxyethyl starch	50 g	Colloid
Insulin	100 U	
Penicillin	40 U	
Dexamethasone	8 mg	

Die Gründe für die spezifische Zusammensetzung von UW-Lösung sind folgende [35]:

1. Minimierung von Zellschwellung durch zwei Zusätze mit hohem relativem Molekulargewicht, Lactobionat und Raffinose
2. Verhinderung der Expansion des Extrazellulärtraumes durch ein stabiles, nicht toxisches Kolloid, Hydroxyäthylstärke
3. Verhinderung von intrazellulärer Azidose durch Weglassen von Glucose
4. Verhinderung von Schäden durch freie Sauerstoffradikale durch Zusatz von Allopurinol und Gluthathion
5. Erleichterung der ATP-Resynthese durch Zusatz von Adenosin

Während der ATP-Gehalt während der warmen Ischämiezeit sinkt, steigt der Gehalt an Adenosin im Gewebe parallel dazu an [93, 94, 100, 140]. Adenosin führt in der Niere zu einer ausgeprägten präglomerulären Vasokonstriktion mit nachfolgendem Abfall der glomerulären Filtrationsrate (GFR) bei Ratte, Hund und Mensch [5, 6, 51, 55, 81, 92, 99, 100].

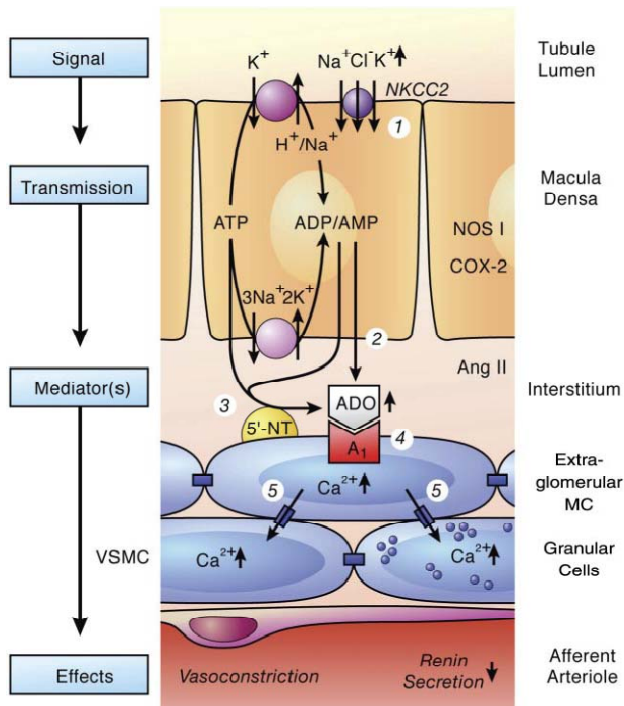
Mit Einleitung der Reperfusion der Transplantatniere führt das in der UW-Lösung enthaltene Adenosin zu einer Vasokonstriktion. Diese Vasokonstriktion verhindert eine ausreichende initiale Durchblutung des Transplantats und kann zu einer weiter anhaltenden Ischämie führen. Durch die zusätzlich vermehrte endogene Adenosinbildung durch den beginnenden ATP-Umsatz ergibt sich ein *circulus vitiosus* (Abb.8, [17, 97, 100]). Die resultierende glomeruläre Hypofiltration trägt entscheidend zu einer verzögerten Funktionsaufnahme des Transplantates und zur Entstehung eines möglichen initialen Transplantatversagens bei.



**Abb. 8:** Vereinfachtes Schema eines *circulus vitiosus* aus Adenosinfreisetzung → Vasokonstriktion → Ischämie und wiederum Adenosinfreisetzung in der Entwicklung eines initialen Transplantatversagens nach Reperfusion.

Des Weiteren hemmt Adenosin die Reninfreisetzung [2, 4, 6, 28, 34, 101, 133] und ist entscheidender Mediator des tubuloglomerulären Feedbacks (Abb. 9, [23, 98, 130, 135]). Diese renalen Wirkungen werden hauptsächlich über Adenosin A<sub>1</sub>-Rezeptoren vermittelt [58, 59, 70, 94, 110, 143].

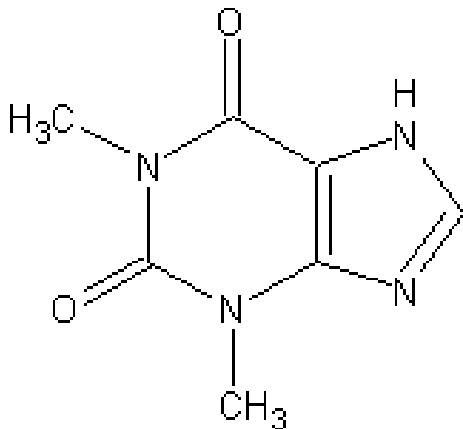




**Abb. 9:** Möglicher Mechanismus von Adenosin als Mediator des tubuloglomerulären Feedbacks. 1. Zunahme der konzentrationsabhängigen Aufnahme von  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  und  $\text{Cl}^-$  über den furosemid-sensitiven  $\text{Na}^+-\text{K}^+-2\text{Cl}^-$  Cotransporter; 2. und 3. Transportabhängige, intra- und/oder extrazelluläre Bildung von Adenosin; 4. Extrazelluläres Adenosin aktiviert Adenosin- $\text{A}_1$ -Rezeptoren und triggert dadurch eine Zunahme von zytosolischem  $\text{Ca}^{2+}$  in extraglomerulären Mesangiumzellen; 5. Die intensive Koppelung zwischen extraglomerulären Mesangiumzellen, reninenthaltenden Zellen und glatten Muskelzellen der afferenten Arteriole über gap junctions erlaubt die Übertragung des erhöhten  $\text{Ca}^{2+}$ -Signals, was in einer Vasokonstriktion der afferenten Arteriole und einer Inhibition der Reninausschüttung resultiert. (Modifiziert nach Vallon [138])

Weitere Untersuchungen zum Pathomechanismus des Ischämie-/Reperfusionsschadens, durchgeführt von Lee und Emala, zeigten, dass das vom Herzen bekannte Phänomen des „preconditioning“ auch in der Niere zu finden ist. Hierunter versteht man eine Zunahme der Ischämietoleranz der Niere durch vorausgehende, kurze Ischämiezeiten. Es zeigte sich bei diesen Untersuchungen, dass die intrarenalen Adenosinrezeptoren  $\text{A}_1$  und  $\text{A}_3$  bei der Entwicklung der Ischämietoleranz beteiligt sind [71, 72]. Die Behandlung mit einem unselektiven Adenosinrezeptor-Antagonisten erhöhte die Toleranz der HK-2 Zellen gegenüber  $\text{H}_2\text{O}_2$  [73].  $\text{A}_3$ -Rezeptor knock-out-Mäuse hatten dementsprechend eine signifikant bessere Nierenfunktion und eine weniger geschädigte Nierenhistologie 24 Stunden nach einem Ischämie-/Reperfusionsschaden als Kontroll-Mäuse [74].

### 1.5 Theophyllin



**Abb.10:** Strukturformel des Theophyllins

Theophyllin (1,3-Dimethylxanthin, Abb. 10) ist ein zur Gruppe der Methylxanthine gehörender, unselektiver, kompetitiver Adenosinantagonist *in vivo* mit Molmasse 180,2. Die Grundstruktur von Theophyllin ist das Xanthin, ein Dioxypurin, welches mit der Harnsäure strukturell verwandt ist [49]. Durch Addition von Methylgruppen an unterschiedliche Positionen dieser Ringstruktur kommt es zur Bildung der unterschiedlichen Methylxanthine.

In therapeutischen Dosen wirken Methylxanthine stimulierend auf die Großhirnrinde und führen zu einem Anstieg der psychischen und motorischen Funktionen [18]. So führt die Stimulation des Zentralnervensystems zu Beseitigung von Müdigkeit und steigert die Aufmerksamkeit [27]. Des Weiteren wird die CO<sub>2</sub>-Empfindlichkeit des Atemzentrums erhöht und damit eine Steigerung des Atemminutenvolumens bewirkt [115].

Peripher führen Xanthinderivate zu einer Relaxation der glatten Muskulatur im Bronchialbereich, was die therapeutische Anwendung als Antiasthmatica erklärt [115]. Zum anderen wirken sie stimulierend auf das Herz-Kreislaufsystem durch Erhöhung der Herzfrequenz. Gemeinsam mit einem geringgradig erhöhtem peripheren Gefäßwiderstand führt dies zu einer verstärkten Organdurchblutung [113]. Die Zunahme der Leistungsfähigkeit der quergestreiften Muskulatur und

damit die Zunahme der Zwerchfellkontraktilität führen ebenfalls zu einem positiven Effekt auf die Atemfunktion. Der Einsatz von Coffein zur Therapie von migräneartigen Kopfschmerzen hingegen beruht auf einer vasokonstriktiven Wirkung der Methylxanthine im zerebrovaskulären System, was zu einer Verminderung des zerebralen Blutflusses und einem geringeren Sauerstoffpartialdruck führt [113]. Des Weiteren wird ihnen eine Steigerung der Lipolyse und Glykogenolyse zugeschrieben [49].

Diese Wirkungen beruhen überwiegend auf drei Hauptmechanismen, der Kalziummobilisation, der unspezifischen Hemmung der Phosphodiesterase und dem Adenosinrezeptor-Antagonismus [27].

### **1.5.1 Adenosinrezeptorantagonismus**

Die kompetitive Hemmung von Adenosinrezeptoren wird als Hauptmechanismus für die pharmakologische Wirkung der Methylxanthine angesehen [30, 41, 45, 46]. Die Hauptrolle bei der Wirkungsvermittlung der Methylxanthine kommt durch die AdoRA1 und AdoRA2A zustande, da sie im Tiermodell durch niedrige Adenosinkonzentrationen aktiviert werden [43, 89]. Zur Aktivierung des AdoRA2B sind höhere Adenosinkonzentrationen nötig, als sie unter physiologischen Bedingungen erreicht werden, jedoch scheint es unter pathophysiologischen Umständen möglich, dass dieser Rezeptor durch endogenes Adenosin aktiviert wird und z.B. Coffein als Inhibitor fungieren kann [43]. Im Hinblick auf die Methylxanthine scheint der A3-Rezeptor nur von geringer Bedeutung zu sein [43, 89]. Theophyllin blockiert unselektiv Adenosinrezeptoren an der Außenseite der Zellmembran. Die halbmaximale Hemmkonzentration liegt bei 3  $\mu\text{M}$ , folglich hemmt Theophyllin die Adenosinwirkung in therapeutischen Dosen [92].

### **1.5.2 Hemmung der Phosphodiesterasen**

Methylxanthine hemmen die für den cAMP-Abbau verantwortliche Phosphodiesterasen (PDE) direkt, es kommt zu einem Anstieg des cAMP im Zytosol [9, 24, 116, 131]. Zur Hemmung der Phosphodiesterasen sind

Koffeinkonzentrationen von 0,1 – 1 mmol/l nötig, eine gewisse PDE-Hemmung durch Theophyllin kann ab Konzentrationen von 50 µmol/l beobachtet werden. Ab einer ca. 20%igen PDE-Hemmung kann es bereits zu lipolytischen Vorgängen kommen [9].

### **1.5.3 Kalziummobilisation**

1961 konnte erstmals an Skelettmuskelpräparaten eine Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentrationen durch Coffein nachgewiesen werden [12]. Durch Erhöhung des intrazellulären Kalziumspiegels wird eine Muskelkontraktion ausgelöst. Hierbei wird Kalzium vermehrt aus dem sarkoplasmatischen Retikulum freigesetzt und seine Rückspeicherung gehemmt [15, 26, 57, 62, 128, 141]. Für die Freisetzung von Kalzium über spezielle Kalziumionenkanäle und die Wiederaufnahme werden Koffeinkonzentrationen von 1 – 25 mmol/l angegeben [106]. Coffein, Theophyllin und Theobromin bewirken am isolierten Skelettmuskel in Konzentrationen von 1,25 mmol/l jeweils denselben positiven Effekt auf die Kalziumfreisetzung aus dem sarkoplasmatischen Retikulum [119]. Auch die Kontraktionskraft des Herzens wird durch Coffein, Theophyllin und Theobromin im selben Maße erhöht [16].

### **1.5.4 Theophyllin und akutes Nierenversagen**

In tierexperimentellen und klinischen Studien konnte die Wirksamkeit von Adenosinrezeptor-Antagonisten bei Nierenfunktionsverschlechterungen, die mit einer renalen Vasokonstriktion einhergehen, nachgewiesen werden. In verschiedenen Modellen des akuten Nierenversagens konnte mit Adenosinrezeptor-Antagonisten eine Verbesserung der Nierenfunktion erzielt werden (Tabelle 2).

**Tab. 2:** Verbesserung der Nierenfunktion durch Adenosinrezeptor-Antagonisten bei verschiedenen Modellen des akuten Nierenversagens

Modell des ANV	Art	Adenosin Rezeptor-Antagonist	Literatur
Ischämie (KAR)	Ratte	Theophyllin	[48, 54, 76, 77, 95]
Glycerol- Injection	Ratte	Theophyllin	[13, 14]
		8-phenyl-Theophyllin	[22, 146]
		DPCPX	[66, 105]
		FR-113453	[56]
		KW-3902	[132]
UranylNitrat	Ratte	Theophyllin	[95]
Cisplatin	Ratte	Theophyllin	[53]
		DPCPX	[69]
		KW-3902	[88]
	Mensch	Theophyllin	[10]
Kontrastmittel	Hund	Theophyllin	[3]
	Mensch	Theophyllin	[37, 38, 65]
	Ratte	DPCPX	[39]
Endotoxin	Ratte	DPCPX	[69]
Amphotericin B	Ratte	Theophyllin	[52, 78]
	Hund	Theophyllin	[47]
Gentamicin	Ratte	KW-3902	[145]
Tacrolimus	Mensch	Aminophyllin	[82]

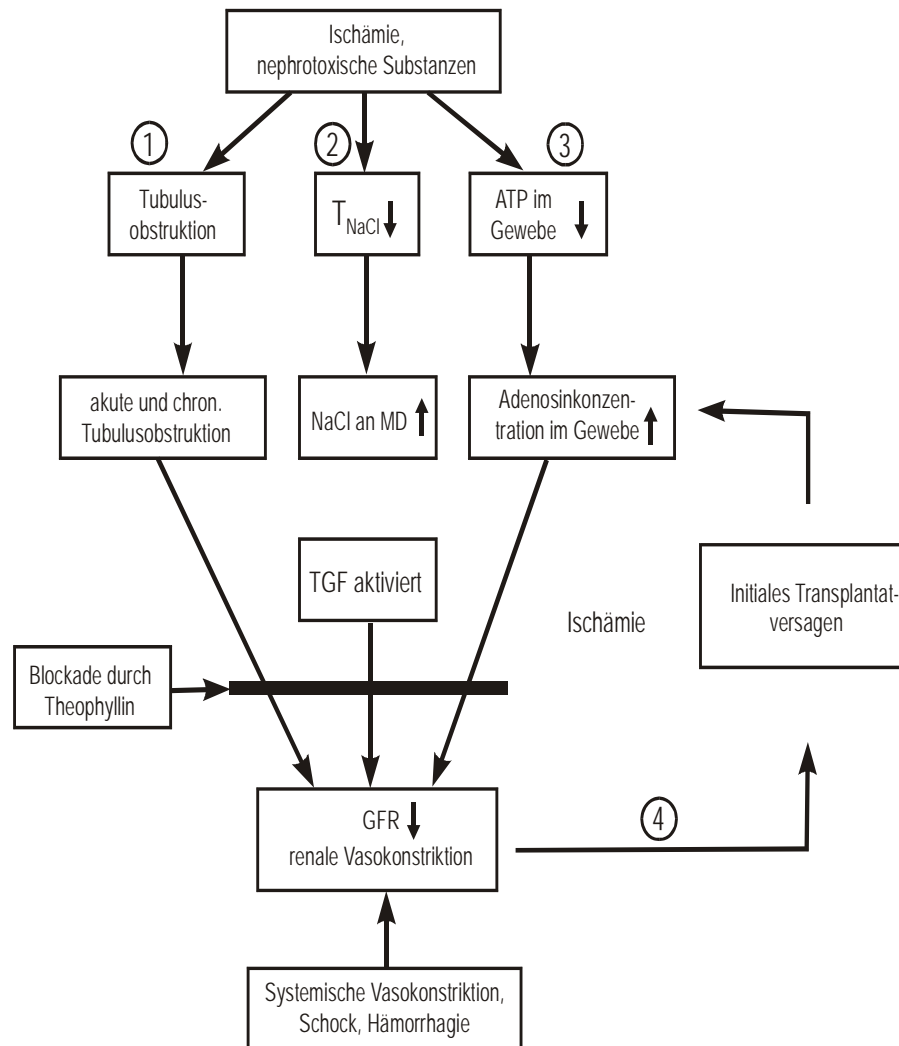
KAR = Klemmung der Arteria renalis; DPCPX, FR-113453 und KW-3902 sind Adenosin-A<sub>1</sub> Rezeptorantagonisten

Das akute Nierenversagen ist definiert als eine rasche, akut einsetzende, Verschlechterung der Nierenfunktion mit Akkumulation harnpflichtiger Stoffwechselprodukte, oftmals verbunden mit dem Verlust der Fähigkeit zur Aufrechterhaltung der Flüssigkeits-, Elektrolyt- und Säure/Basen-Homöostase [134]. Das akute Nierenversagen wird in drei Gruppen eingeteilt, das prärenale, das renale (intrinsische) und das postrenale Nierenversagen.

Das prä- und postrenale Nierenversagen ist prinzipiell nach Beseitigung des zugrunde liegenden Problems vollständig reversibel. Bei längerem Bestehen kann es jedoch zur strukturellen Schädigung der Niere, einer akuten Tubulusnekrose, und damit zum Übergang in ein intrinsisches Nierenversagen kommen, welches nicht mehr unmittelbar reversibel ist. Weitere Ursachen für ein intrinsisches Nierenversagen sind Glomerulonephritiden und die interstitielle Nephritis.

Die akute Tubulusnekrose ist meist ischämisch oder toxisch bedingt und unterscheidet sich vom akuten prärenalen Nierenversagen durch den Verlauf, der sich häufig in drei Phasen einteilen lässt, die Schädigungsphase, die Konsolidierungsphase und die Erholungsphase.

Abbildung 9 fasst schematisch die pathophysiologischen Mechanismen beim akuten Nierenversagen zusammen, bei denen Adenosin beteiligt ist. Eine durch Adenosin bedingte postglomeruläre Vasodilatation verstärkt neben der präglomerulären Vasokonstriktion weiter den Abfall der glomerulären Filtrationsrate, insbesondere in der tiefen Rindenregion [17].



**Abb. 9:** Schema der pathophysiologischen Prozesse, die ein Nierenversagen auslösen und an seinem Fortbestehen beteiligt sind. Die renale Ischämie und nephrotoxische Substanzen führen, **(1)** durch Schädigung der Tubuli zur Ablösung des Bürstensaums mit nachfolgender Tubulusobstruktion, **(2)** zur Verminderung der Natriumrückresorption im proximalen Tubulus mit nachfolgender Erhöhung der NaCl Konzentration an der Macula densa (MD) und Verstärkung des tubuloglomerulären Feedbacks (TGF), und **(3)** zum Abfall der ATP Konzentration mit nachfolgendem Anstieg der Adenosinkonzentration im Gewebe. Diese drei intrarenalen Faktoren senken die glomeruläre Filtrationsrate (GFR), die durch systemische Faktoren noch weiter abfallen kann. Theophyllin steigert in dieser Situation die GFR durch Blockade des TGF sowie durch Hemmung der Vasokonstriktion, die durch das intrarenal akkumulierte Adenosin ausgelöst wird. **(4)** ein *circulus vitiosus* aus Adenosinfreisetzung, Vasokonstriktion, Ischämie und wiederum Adenosinfreisetzung in der Entwicklung eines initialen Transplantatversagens nach Reperfusion.

### 1.6 Studienziel

Ischämie- und Reperfusionsschäden (I/R-Schäden) bei der humanen Nierentransplantation können Ursache einer verzögerten Funktionsaufnahme bis hin zum initialen Transplantatversagen sein. Ein Faktor, der in der Niere bei Ischämie aus dem ATP Abbau entsteht, ist das Adenosin. Es führt in der Niere über eine präglomeruläre Vasokonstriktion und eine postglomeruläre Dilatation zu einem Abfall der glomerulären Filtrationsrate und kann, insbesondere bei Ischämie, zur Entstehung des akuten Nierenversagens beitragen, wie zahlreiche tierexperimentelle Studien belegt haben. In der vorliegenden Studie soll untersucht werden, ob durch Blockade der Adenosinrezeptoren mit dem unselektiven kompetitiven Adenosinrezeptorantagonisten Theophyllin die Inzidenz des initialen Transplantatversagens reduziert und die Transplantatfunktion verbessert werden kann.

Im Einzelnen ergaben sich folgende Fragestellungen:

1. Führt die Behandlung mit Theophyllin im Vergleich zur Kontrollgruppe zu einer besseren Transplantatfunktion während des frühen postoperativen Verlaufs (am 5. postoperativen Tag)?
2. Zeigen sich durch die Theophyllinbehandlung Unterschiede beim histologischen und immunhistochemischen Befund der Transplantate?
3. Bestehen Unterschiede in der Konzentration von proinflammatorischen (IL-2, IL-6, TNF- $\alpha$ ) und antiinflammatorischen (IL-10) Zytokinen im Serum bei Tieren mit und ohne Theophyllinbehandlung?
4. Wird durch Theophyllin die Expression der A1AR-, A2AAR-, A2BAR- und A3AR-mRNA in der Niere beeinflusst?



## **2. Material und Methoden**

### **2.1 Versuchstiere**

Als Versuchstiere wurden männliche Fisher F-344 und Lewis-Ratten (Charles River GmbH, Sulzfeld) verwendet. Die Tiere hatten bei Lieferung ein Gewicht von 200-250g und wurden im Tierstall des Pharmakologischen Instituts gehalten (Standardkäfig, Ehret Emmendingen, Streu Weichholzfaser 3-4, Typ: 99190200, Altromin GmbH, Lage). Im Tierstall herrschte ein künstlicher Tag-/Nachtrhythmus im 12-Stunden-Wechsel, eine Temperatur von 22,5°C und eine Luftfeuchtigkeit von 60 g%/m<sup>3</sup>. Die Ratten hatten freien Zugang zu einer pelletierten Standardnahrung (Altromin, Haltung, C1324, Altromin GmbH, Lage, Deutschland) und erhielten Leitungswasser ad libidum.

### **2.2 Technik der Nierentransplantation**

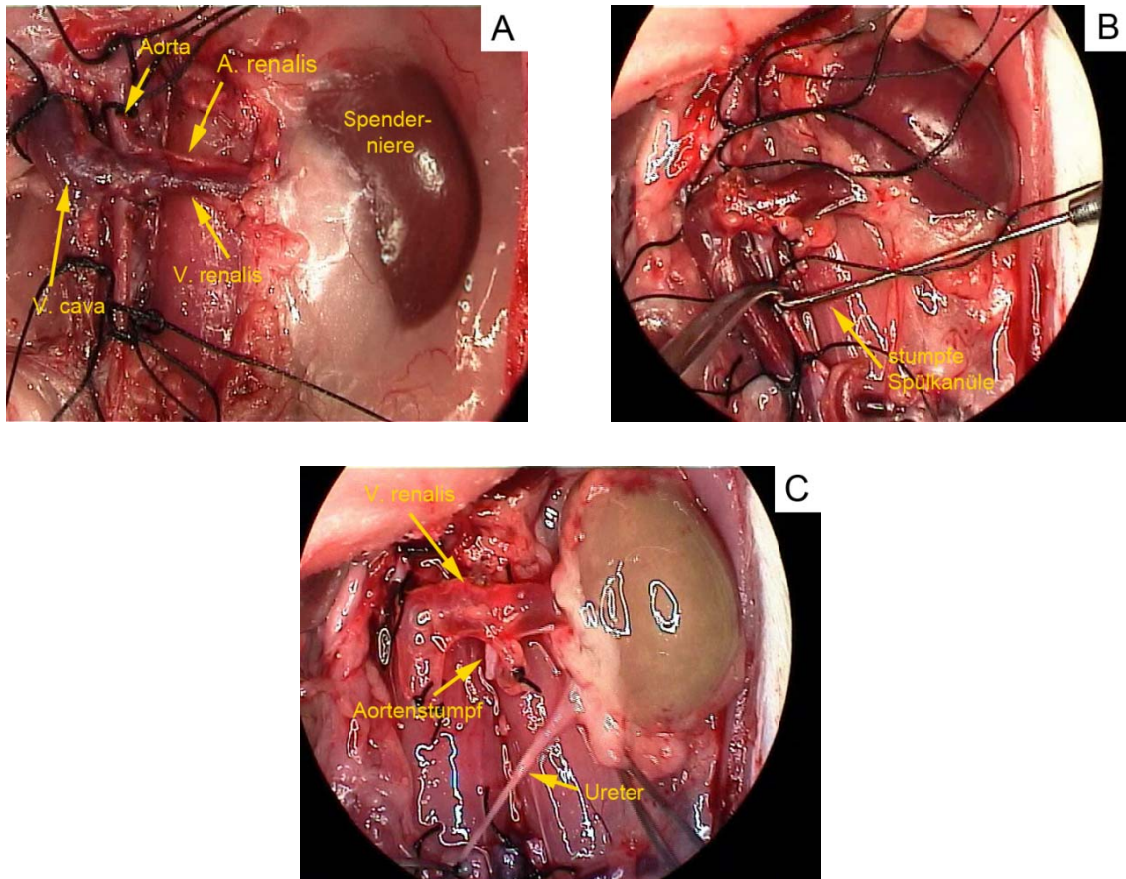
#### **2.2.1 Hilfsmittel**

Mit mikrochirurgischen Instrumenten unter Zuhilfenahme eines Operationsmikroskops wurden die Transplantationen in Äthernarkose im nephrologischen Labor des Instituts für Pharmakologie und Toxikologie durchgeführt. Die Instrumente waren sterilisiert, Hände, Versuchstiere und Arbeitsplatz wurden desinfiziert.

### 2.2.2 Explantation

Die Versuche wurden an nicht nüchternen Fisher-Ratten durchgeführt. Das Tier wird in Äthernarkose auf dem Rücken liegend auf einer Korkplatte gelagert. Nach Längslaparatomie wird Dün- und Dickdarm in ein mit physiologischer Kochsalzlösung getränktes Tuch eingeschlagen und nach außen verlagert. Magen und Milz werden mit einem feuchten Tupfer bedeckt und mittels eines Spiekers nach oben verlagert. Die nun freigelegte linke Niere wird ebenfalls mit einem feuchten Tupfer bedeckt um einer etwaigen Austrocknung vorzubeugen. Der Ureter wurde aufgesucht, mittels Pinzetten stumpf aus dem Fettgewebe freigelegt und mit chirurgischer Seide (4-0) möglichst weit distal umschlungen. Nun wurden Aorta abdominalis und Vena cava inferior unterhalb des linken Nierenarterien- und Nierenvenenabgangs von Fettgewebe befreit und stumpf voneinander getrennt. Die Gefäße wurden danach mit einer gebogenen stumpfen Pinzette unterfahren um in die Tiefe gehende Abgänge zu finden. Diese Abgänge wurden je nach Größe entweder koaguliert oder ligiert und danach durchtrennt. Auch Arteria und Vena renalis wurden etwa bis zum Abgang der Vena suprarenalis dargestellt und voneinander getrennt. Danach wurden Schlingen aus chirurgischer Seide proximal und distal des Nierenarterien- und Nierenvenenabgangs locker sowohl um Vena cava inferior als auch um Aorta abdominalis gelegt. Es erfolgte nun eine Injektion von 1ml heparinisierte Kochsalzlösung (100 I.E in 0,85% NaCl) in die Schwanzvene des Versuchstieres. Nach etwa einer Minute wurden erst die distalen Schlingen zugezogen, danach die proximalen. Die Aorta wurde distal des Nierenarterienabgangs mittels einer Mikroschere inzidiert und eine gebogene stumpfe Kanüle eingeführt, die mittels einer Ligatur aus chirurgischer Seide um die Aorta fixiert wurde. Die Vena cava wurde ebenfalls zwischen den beiden Ligaturen inzidiert, um einen ungehinderten Abfluss des Blutes und Perfusats zu gewährleisten. Die Niere wurde nun mit 10ml gekühlter UW-Lösung (4°C) bis zur vollständigen Entfärbung perfundiert. Nach Entfernung der Kanüle wurde die Niere aus dem perirenal Fettgewebe gelöst, die Aorta wurde proximal der oberen Ligatur und an dem geschaffenen Kanülenzugang durchtrennt, die Vena renalis wurde nahe der Vena cava durchtrennt. Die Ureterligatur wurde

zugezogen und distal der Ligatur der Ureter durchtrennt. Die Niere wurde nun entnommen und bis zur Implantation 2 Stunden bei 4°C in UW-Lösung aufbewahrt. Die Dauer des Eingriffs betrug zwischen 15 und 20 Minuten (Abb.10).



**Abb. 10:** Entnahme der Spenderniere: (A) Spenderniere mit präparierten Gefäßen, (B) Spenderniere unmittelbar vor Perfusion mit UW-Lösung, (C) Spenderniere nach Perfusion und Absetzung der Gefäße und des Ureters

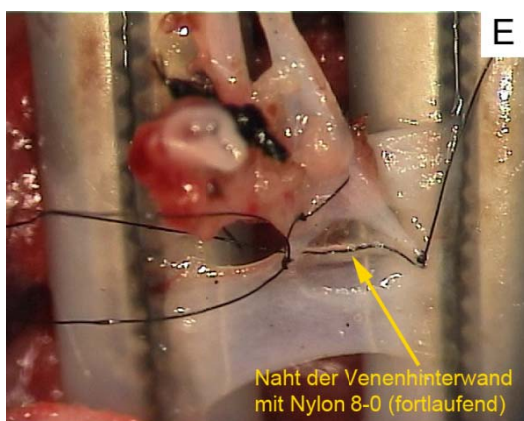
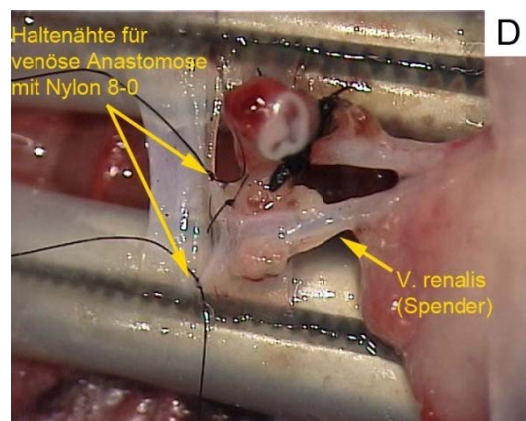
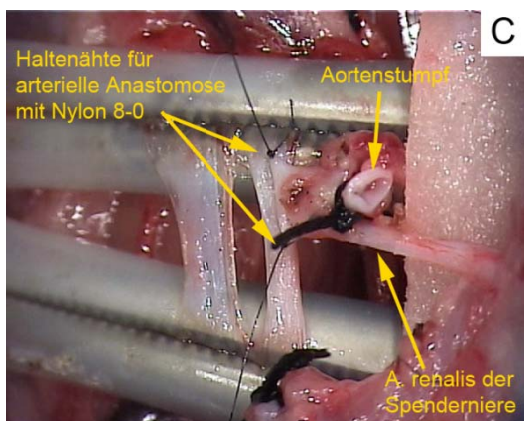
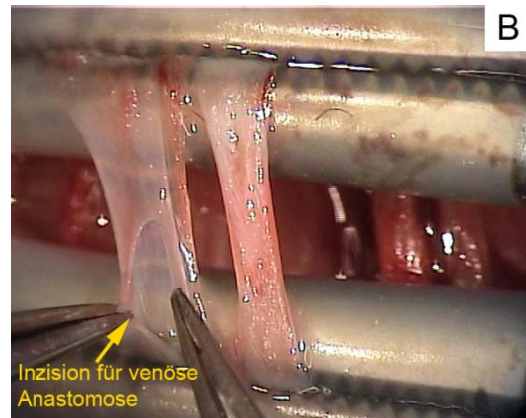
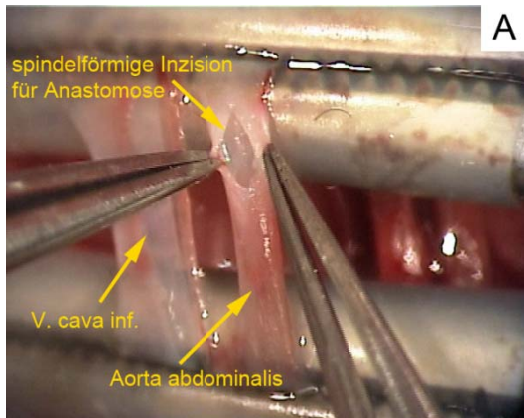
### 2.2.3 Transplantation

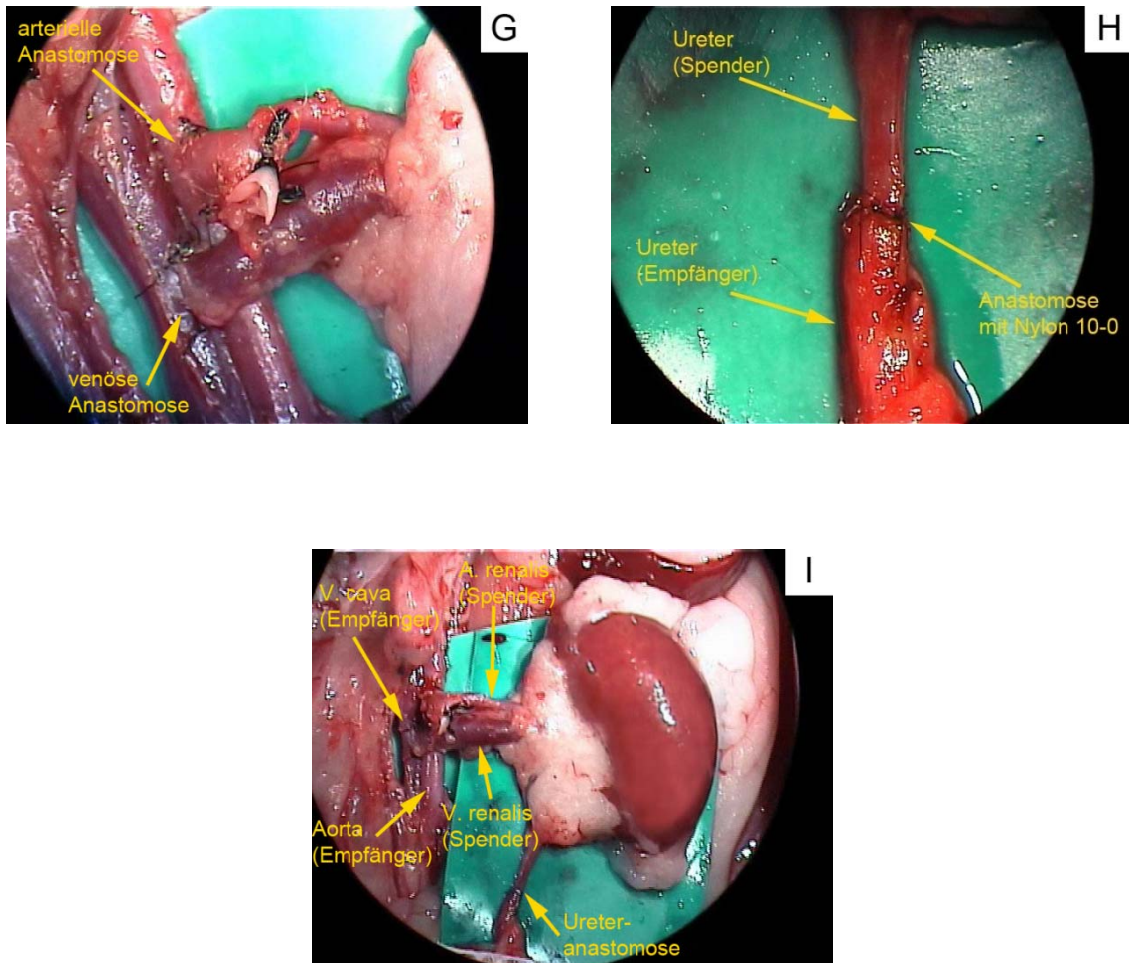
Das Abdomen des Empfängertiers (Lewis-Ratte) wurde in gleicher Weise wie beim Spendertier eröffnet, das Operationsgebiet in gleicher Weise abgedeckt und vorbereitet. Der linke Ureter wurde stumpf freipräpariert, mit chirurgischer Seide hilusnah unterbunden und proximal der Ligatur durchtrennt. Nach Unterbindung und Durchtrennung von Nierenarterie und -vene distal des Zuflusses der Nebennierengefäße wurde die Niere entfernt. Aorta und Vena cava wurden von Fettgewebe befreit, mobilisiert und auf einer Strecke von ca. 1 cm stumpf voneinander getrennt, etwaige Abgänge auf dieser Strecke wurden koaguliert und durchtrennt. Es wurden Klemmen proximal und distal dieses Segments gesetzt, die Gefäße punktiert und mit heparinisierte Kochsalzlösung gespült. Danach wurden die Gefäße entsprechend der Größe der Spendergefäße mit einer Mikroschere eröffnet, wobei aus Aorta eine Spindel herausgeschnitten wurde, die Vene wurde lediglich in entsprechender Größe längs im linken Drittel des Gefäßdurchmessers inzidiert. Das Transplantat wurde nun unter weiterer Kühlung in Position gebracht und zuerst eine End-zu-Seit-Anastomose des Aortensegments mit der Aorta abdominalis des Empfängers erstellt. Hierzu wurden kranial und kaudal je ein Eckfaden gelegt, anschließend mit fortlaufender Nahttechnik zuerst die linke Wand, nach Wendung des Transplantats die rechte Wand genäht. Als Nahtmaterial diente Nylon 8/0.

Danach erfolgte die End-Zu-Seit-Anastomose der Vena renalis mit der Vena cava inferior des Empfängers. Hierzu wurden ebenfalls zwei Eckfäden gelegt, das Tier um 90° gedreht und ebenfalls mit fortlaufender Nahttechnik gearbeitet, wobei zuerst die Hinterwand vom Gefäßinneren her genäht wurde.

Nun wurden Gefäßklemmen auf Arteria und Vena renalis gesetzt, danach die Klemmen von Aorta und Vena cava entfernt. Die Reperfusion des Organs erfolgte erst nach sorgfältiger Blutstillung. Im nächsten Schritt wurden Spender- und Empfängerureter anastomosiert. Hierzu wurde nach Präparation der Ureteren und Kürzen auf die richtige Länge eine End-zu-End-Anastomose mit

vier Einzelknopfnähten durchgeführt. Als Nahtmaterial diente Nylon 10/0. Die Niere wurde nun mit zwei Stichen durch perirenales Fettgewebe am oberen und unteren Nierenpol des Transplantats und Fettgewebe des Empfängers fixiert (Nahtmaterial Vicryl 5/0).





**Abb 11. (A-I):** Ablauf der Nierentransplantation: (A) Vorbereitung der arteriellen Anastomose, (B) Vorbereitung der venösen Anastomose, (C) Fixierung des Aortenstumpfes über Haltenähte, (D) Fixierung der Vena renalis (Spender) an Vena cava (Empfänger) über Haltenähte, (E) fertige Naht der Venenhinterwand, (F) Veranschaulichung der Grössenverhältnisse mit Millimeterpapier, (G) fertiggestellte Anastomosen nach Reperfusion, (H) fertige Anastomose des Ureters, (I) reperfundierte Niere bei OP-Ende

Zum Schluss wurde nach Verlagerung des Dünndarmkonvoluts nach links die Nephrektomie der rechten Niere durchgeführt.

Das Erstellen der Gefäßanastomosen und somit die warme Ischämiezeit dauerte zwischen 30 und 40 Minuten, das der Ureteranastomose ca. 6 min. Die gesamte Operationsdauer betrug ca. 90min.

### 2.3 Inulin-Clearance

#### 2.3.1 Narkose

Die Narkose wurde durch intraperitoneale Injektion von Thiopentobarbital (Inactin®) eingeleitet. Die Initialdosis betrug 80 mg/kg Körpergewicht, eventuell nötige Nachinjektionen wurden in Schritten von 10mg/kg durchgeführt. Eine ausreichende Narkosetiefe wurde durch Überprüfung des Cornealreflexes bzw. dessen Erlöschen festgestellt.

#### 2.3.2 Präparation

Die narkotisierten Tiere wurden auf dem Rücken liegend auf einem beheizbaren Präparationstisch gelagert, eine konstante Körpertemperatur von ca. 37°C wurde mittels einer an das Heizgerät des Tisches angeschlossene, rektal eingeführten Temperatursonde gewährleistet.

Es wurde ein medianer, ca. 3cm langer Halsschnitt durchgeführt, das darunter liegende Gewebe einschließlich der infrahyalen Muskulatur stumpf durchtrennt und die Trachea dargestellt. Diese wurde zwischen zwei Knorpelspangen inzidiert, ein Polyethylenkatheter ca. 1,5cm weit eingeführt und mit zwei Knoten fixiert. Dies gewährleistete eine ungehinderte spontane Atmung der Tiere, eine etwaige Verschleimung der Atemwege konnte so rechtzeitig bemerkt werden. Danach wurde die rechte Vena jugularis externa aufgesucht, auf einer Länge von ca. 1 cm dargestellt und nach kranial unterbunden. Nach kaudal wurde eine Gefäßklemme gesetzt, die Vene wurde zwischen Klemme und Ligatur inzidiert und zwei Polyethylenkatheter eingeführt. Die Katheter wurden mittels chirurgischer Seide (4/0) fixiert. Die Katheter waren an Perfusorspritzen angeschlossen, die in entsprechenden Perfusoren bereitlagen. Über einen Katheter erfolgte die Infusion des Inulin / PAH - Gemisches, über den anderen

die Infusion von physiologischer Kochsalzlösung (0,85% NaCl). Nach Ende der Präparation des Halses wurde das Präparationsgebiet mit einer Polymerfolie abgedeckt und sofort die Infusionen gestartet. Nun wurde ein Schnitt in der linken Leistenregion durchgeführt und die Gefäß- / Nervenbahn bestehend aus Arteria und Vena femoralis sowie Nervus femoralis aufgesucht und dargestellt. A. femoralis wurde von Vene und Nerv stumpf gelöst und nach distal unterbunden. Nach proximal wurde eine Gefäßklemme gesetzt, dazwischen das Gefäß inzidiert, ein Polyethylenkatheter eingeführt und mittels zweier Knoten mit chirurgischer Seide fixiert. Dieser war mit heparinierter Kochsalzlösung gefüllt (100 I.E. Heparin /1ml 0,85% NaCl), über ein Druckelement (WK 280, WKK, Kaltbrunn, Schweiz) erfolgte die kontinuierliche Blutdruckmessung während des gesamten Versuchs. Das Präparationsgebiet wurde wieder mit einer Polymerfolie abgedeckt.

Nun wurde eine Längslaparatomie links der Narbe der Transplantations-OP durchgeführt. Erst wurde die Haut, danach die Bauchwand auf kurzer Strecke durchtrennt. Nun wurde für etwa 10 Sekunden eine Peritonealklemme gesetzt um Blutungen zu verzögern, die Bauchwand wurde entlang der geklemmten Strecke durchtrennt. Verletzte Gefäße wurden sofort koaguliert um den Blutverlust so gering wie möglich zu halten. Der Darm wurde nach rechts verlagert und die transplantierte Niere aufgesucht. Der Ureter wurde vorsichtig freipräpariert und distal der Anastomose inzidiert. Ein Polyethylenkatheter (0,28mm ID, 0,61mm AD) wurde nun eingeführt, welcher über die Anastomose hinweg bis kurz vors Nierenbecken geschoben wurde. Der Katheter wurde proximal der Anastomose mit chirurgischer Seide fixiert. Der Urin wurde über den Katheter in ein verschließbares Eppendorfgefäß (1ml) abgeleitet. Nach Rückverlagerung des Darmes wurde auch hier das Präparationsgebiet mit einer Polymerfolie abgedeckt. Die gesamte Präparationsdauer betrug ca. 70 Minuten.



### 2.3.3 Clearance

Die Durchführung der Clearance-Experimente erfolgte nach derselben Methode, wie sie schon von Luippold et al. Beschrieben wurde [80]. Während der gesamten Dauer der Clearance erfolgte die Infusion von  $^3\text{[H]}$ -Inulin mit einer Geschwindigkeit von 0,6ml/h sowie von isotonischer Kochsalzlösung (NaCl 0,85%) mit einer Geschwindigkeit von 3,0 ml/h in die rechte V. jugularis externa. Nach einer Äquilibrationsphase von 60 - 90 Minuten wurde mit der ersten Sammelperiode begonnen. Die Periodendauer betrug 20 bzw. 30 Minuten (abhängig von der ausgeschiedenen Urinmenge). Der Urin wurde in Eppendorfgefäßen gesammelt, nach der Hälfte der Periodendauer (nach 10 bzw. 15min) wurden 2 Röhrchen à 70µl arterielles Blut über den in der A. femoralis liegenden Katheter abgenommen. Der Hämatokrit wurde bestimmt und das Serum in ein Eppendorfgefäß abpipettiert.

Nach erfolgreicher Clearance wurde die Niere entnommen und halbiert. Eine Hälfte wurde in flüssigem Stickstoff eingefroren und anschließend bei  $-80^\circ\text{C}$  aufbewahrt, die andere Hälfte wurde in Formalin eingelegt und ans pathologische Institut zur Einbettung in Paraffin gebracht. Ebenfalls abgenommen wurden 4,5 ml arterielles Blut, welches nach Zentrifugieren und Abpipettieren des Serums bei  $-80^\circ\text{C}$  eingefroren wurde. Dieses Serum wurde zur Bestimmung der Zytokinpiegel verwendet.

Die Bestimmung des Inulin- bzw. PAH-Gehaltes von Serum und Urin der Sammelperioden wurde mittels eines computergesteuerten Counters durchgeführt.

Hierzu wurden jeweils 2x 20µl Serum bzw. Urin (Doppelbestimmung) in Countergefäße pipettiert, mit 5ml UltimaGold-Lösung versetzt, geschüttelt und in ein passendes Rack gestellt. Dieses wurde in den Counter (2550 TR, Canberra Packard, Frankfurt) gestellt und das Programm zur Inulin / PAH-Bestimmung gestartet. Die Ergebnisse wurden in eine Excel-Tabelle zur Berechnung eingegeben.

### 2.4 Versuchsgruppen

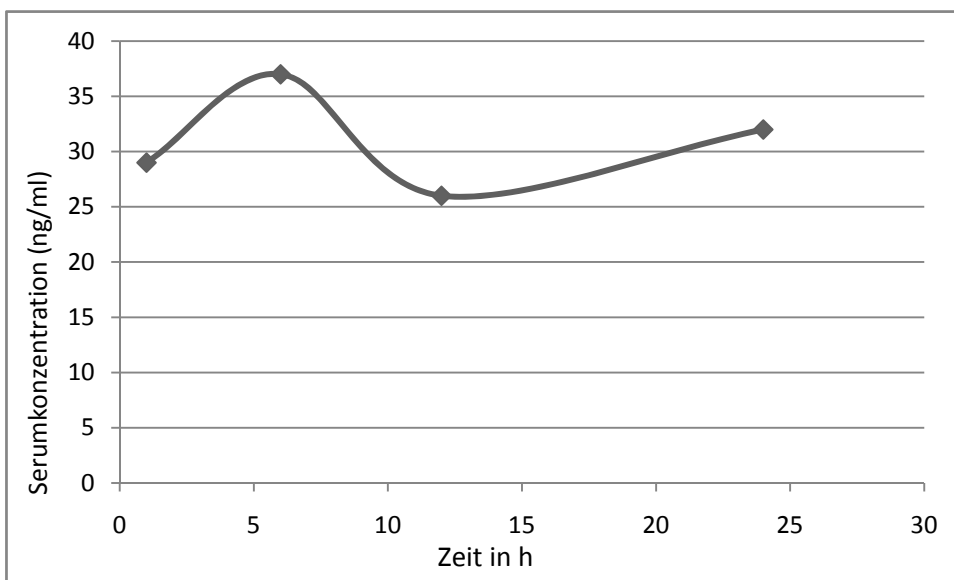
Alle transplantierten Ratten erhielten nach der Transplantation täglich CsA (5mg/kgKG/d s.c., verdünnt in 0,15ml NaCl 0,85%, Sandimmun<sup>®</sup>, Sandoz, Basel, Schweiz) um akute Abstossungsreaktionen zu vermeiden. Die erste Dosis CsA und Theophyllin (Bronchoparat<sup>®</sup>, 6mg/kgKG verdünnt in 0,3ml NaCl 0,85%) wurde unmittelbar vor Transplantation über die Schwanzvene verabreicht. Postoperativ erhielten die Ratten zweimal täglich Theophyllin bis zum Tag vor dem Clearance-Experiment (10mg/kgKG Bronchoparat s.c., letzte Dosis 24h vor Beginn der Clearance). Die Kontrollgruppe erhielt die entsprechende Menge NaCl 0,85%. Der Effekt von CsA und Theophyllin auf die normale Nierenfunktion wurde anhand von unilateral nephrektomierten Lewis-Ratten erfasst.

**Tab. 3:** Einteilung der Versuchsgruppen

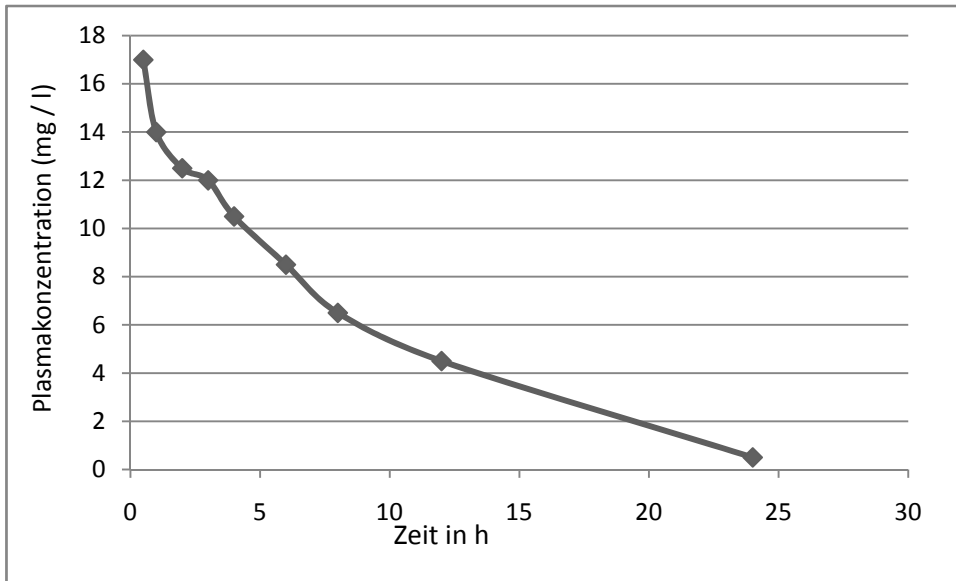
CON-VV	Unilateral nephrektomierte Lewis-Ratten mit Vehikel (n=8)
CON-CV	Unilateral nephrektomierte Lewis-Ratten mit CsA und Vehikel (n=6)
CON-CT	Unilateral nephrektomierte Lewis-Ratten mit CsA und Theophyllin (n=6)
KT-CV	Nierentransplantierte Ratten (F→L) mit CsA und Vehikel (n=10)
KT-CT	Nierentransplantierte Ratten (F→L) mit CsA und Theophyllin (n=9)

## 2.5 Vorversuche zu Dosierung und Wechselwirkungen

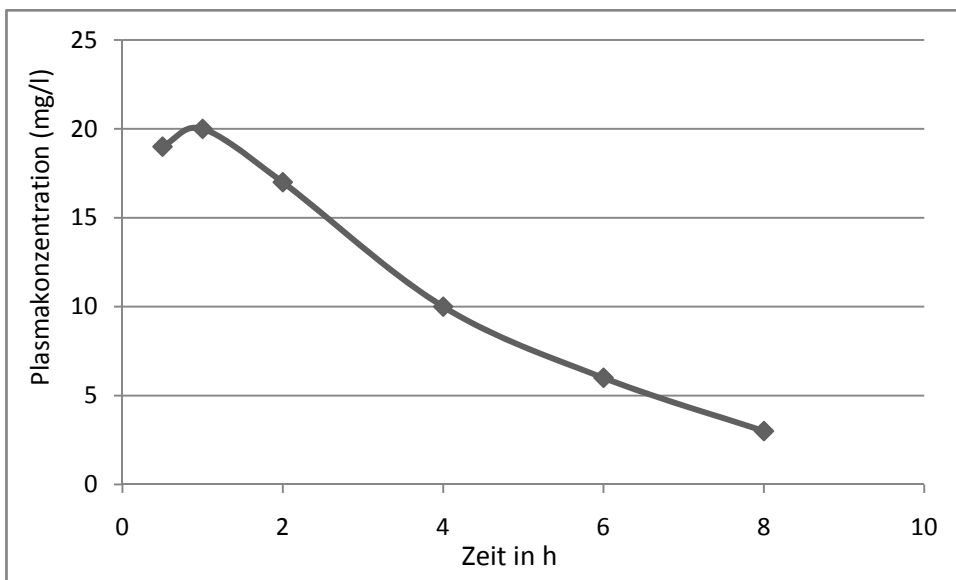
Um einen Theophyllinspiegel zu erreichen, der innerhalb des therapeutischen Fensters (9-16mg/l) liegt, wurden vor Beginn der eigentlichen Experimente Versuche zur Dosisfindung durchgeführt. Es wurden verschiedene Dosierungen, unterschiedliche zeitliche Abstände und verschiedene Applikationsformen (s.c., i.p., p.o.) getestet. Hierbei zeigten die Ratten, die zunächst 6mg/kg KG Theophyllin i.v. über die Schwanzvene, anschliessend zweimal täglich 10mg/kgKG Theophyllin s.c. erhielten, Plasmakonzentrationen nahe des therapeutischen Fensters (8-20 mg/l). Dies entspricht einer in der Veterinärmedizin üblichen Dosierung von Theophyllin [79]. In einer weiteren Versuchsgruppe wurde eine mögliche Interaktion von CsA und Theophyllin untersucht. Unilateral nephrektomierte Ratten erhielten o.g. Theophyllin-Behandlung sowie CsA (5mg/kgKG/d s.c.). Theophyllin- und CsA-Spiegel wurden an Tag 2 und Tag 5 gemessen. Hierbei zeigten sich ähnliche CsA- und Theophyllin-Konzentrationen in allen Versuchsgruppen, was, in Übereinstimmung mit Untersuchungen beim Menschen [29, 40] gegen relevante Interaktionen beider Medikamente spricht.



**Abb. 12:** Verlauf der Serumkonzentration von CsA (Cyclosporin A) bei Einzelinjektion von 5 mg / kg KG s.c. zum Zeitpunkt t=0



**Abb. 13:** Verlauf der Plasmakonzentration bei Einzelinjektion von Theophyllin (6 mg / kg KG i.v.) zum Zeitpunkt t=0



**Abb. 14:** Verlauf der Plasmakonzentration bei Einzelinjektion von Theophyllin (10 mg/kg KG s.c.) zum Zeitpunkt t=0

## 2.6 Pathohistologische Auswertung

Zur histologischen Untersuchung wurden die Nieren in 4,5%iger Formalinlösung fixiert, dehydriert und in Paraffin eingebettet. Es wurden Hämatoxilin-Eosin- sowie PAS-Färbungen von 3µm-Schnitten durchgeführt. Auswertung und Scoring der gesamten Schnittfläche wurden unter 200facher Vergrößerung unter dem Lichtmikroskop durch einen Nephrologen durchgeführt. Der Grad an Glomerulosklerose, vaskulären Läsionen, tubulointerstitiellem Schaden und Infiltration von Entzündungszellen wurden von Grad 0 bis 4+ nach der Banff-97-Klassifikation eingeordnet [111].

## 2.7 Immunhistochemie

In Paraffin eingebettetes Gewebe (3µm Schnittdicke) wurde mit monoklonalen Antikörpern gegen Monozyten/Makrophagen (ED1) und CD5<sup>+</sup> T-Lymphozyten (OX19, CD43, Serotec Camon Labor-Service, Wiesbaden) und dem sekundären anti-Maus IgG-Antikörper vom Kaninchen und dem alkalische-Phosphatase /anti-alkalische-Phosphatase-Komplex (Dako A/S, Hamburg) inkubiert. Schnitte ohne den ersten oder zweiten Antikörper dienten als negative Kontrollen. Die gesamte Schnittfläche jeder Niere wurde bei 400facher Vergrößerung auf Monozyten/Makrophagen und T-Lymphozyten untersucht und, in Abhängigkeit vom Grad der Infiltration, mit dem Score 0 bis 4+ bewertet; Grad 0 entspricht normalem Nierengewebe; Grad 1 entspricht geringer, lokaler Infiltration, Grad 2 entspricht moderater Infiltration an unterschiedlichen Stellen; Grad 3 entspricht schwerer Infiltration <50%; Grad 4 entspricht schwerer, diffuser Infiltration von mehr als 50% des Nierengewebes.

### 2.8 Zytokinkonzentrationen im Serum

Zytokinkonzentrationen (Interleukin (IL) -2, -6, -10, TNF- $\alpha$ ) im Serum wurden mit Hilfe von ELISA-Kits bestimmt (Biosource, California, USA).

### 2.9 Adenosinrezeptor (AdoR) - mRNA-Expression in der Niere

Die relative Quantifizierung der AdoR mRNA wurde mit zwei RT-PCR-Versuchen durchgeführt. Die gesamte RNA wurde mit Hilfe von peqGOLD RNApure entsprechend den Herstellerangaben (Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen) aus dem Nierengewebe isoliert. 500ng jeder Probe wurde durch „Avian Myeloblastosis Virus Reverse Transkriptase“ (Peqlab) mit oligo(dT)<sub>15</sub> in cDNA transkribiert, zufällig ausgesuchte Hexamere wurden als Primer im PCR Puffer II (Applied Biosystems, Foster City, CA) verwendet. Die PCR wurde mit Hilfe eines Lightcycler und des „FastStart DANN Master SYBR Green I kit (Roche Diagnostics, Mannheim) durchgeführt. Die verwendeten Primer-Sequenzen sind in Tabelle 4 aufgeführt: Die relative Expressionsrate der Zielgene wurde auf Basis der Crossing Point (CP) Differenz ( $\Delta$ ) einer unbekannt Probe gegen eine Kontrolle und ihrer Echtzeit-PCR-Effizienz (E), entsprechend des mathematischen Modells nach Pfaffl et al. [107] berechnet. Cyclophilin A (Peptidyl prolyl Isomerase A) wurde als Referenzgen verwendet, um eventuelle Abweichungen bezüglich der Qualität der mRNA und der Menge von Input-cDNA zu erkennen. Um die Echtzeit-PCR-Effizienz zu bestimmen wurde für jedes Transkript eine Verdünnungsreihe der cDNA mit entsprechenden Standardkurven angefertigt.

**Tab. 4:** verwendete Primer Sequenzen

Gene (RefSeq Acc. No.)	Primers (nucleotide position)	Amplicon size
AdoR A1 (NM_017155)		
forward	5'- <sup>694</sup> CTCCATTCTGGCTCTGCTCG <sup>713</sup> -3'	207 bp
reverse	5'- <sup>900</sup> ACACTGCCGTTGGCTCTCC <sup>882</sup> -3'	
AdoR A2a (NM_053294)		
forward	5'- <sup>1898</sup> GCTGCTGGCCTAGAAGTGG <sup>1916</sup> -3'	201 bp
reverse	5'- <sup>2098</sup> TAGCCCTGTGACTAAGTGCATG <sup>2077</sup> -3'	
AdoR A2b (NM_017161)		
forward	5'- <sup>139</sup> TGGCGCTGGAGCTGGTTA <sup>156</sup> -3'	160 bp
reverse	5'- <sup>298</sup> GCAAAGGGGATGGCGAAG <sup>281</sup> -3'	
AdoR A3 (NM_012896)		
forward	5'- <sup>717</sup> CCTCTGCTGGCTAGTGCCTTT <sup>738</sup> -3'	186 bp
reverse	5'- <sup>902</sup> CACATGACAACCAGGGGGAT <sup>883</sup> -3'	
Cyclophilin A (NM_017101)		
forward	5'- <sup>166</sup> GGGGAGAAAGGATTTGGCTA <sup>185</sup> -3'	257 bp
reverse	5'- <sup>422</sup> ACATGCTTGCCATCCAGCC <sup>404</sup> -3'	

### 2.10 Analysen und Berechnungen

Der Hämatokrit wurde nach Zentrifugation von arteriellen Blutproben bestimmt. Inulinkonzentrationen in Plasma und Urin wurden mit Hilfe von Flüssigszintigraphie (2550 TR, Canberra Packard, Frankfurt) bestimmt. Die Glomeruläre Filtrationsrate (GFR) war der Mittelwert von drei Clearance-Perioden. Natrium- und Kaliumkonzentrationen in Plasma und Urin wurden mittels Flammenfotometer (ELEX 6361, Eppendorf, Hamburg) bestimmt. Renale hämodynamische und exkretorische Parameter wurden pro Gramm Nierengewicht mittels Standardformeln berechnet.

### 2.11 Statistische Auswertung

Um den Effekt von Theophyllin auf die GFR, Zytokinserumkonzentrationen und AdoR mRNA Expression auszuwerten wurde die statistische Signifikanz der verschiedenen Versuchsgruppen mittels ANOVA und dem unpaired two-sided t-test bestimmt. Histologische Scores wurden mit der Kruskal-Wallis Methode verglichen. Alle Werte sind als Mittelwert  $\pm$  SEM dargestellt. P-Werte  $<0,05$  wurden als statistisch signifikant angesehen. Alle statistischen Berechnungen wurden mit dem Programm JMP<sup>®</sup> 6.0 (SAS Institute, Cary, NC, USA) durchgeführt.



### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Transplantatfunktion

Bei unilateral nephrektomierten Kontrollratten (CON-VV) wurde weder durch CsA-Behandlung (CON-CV) noch durch die Kombination von CsA und Theophyllin (CON-CT) das Körpergewicht, Nierengewicht, Hämatokrit oder der mittlere arterielle Blutdruck (MAP) signifikant verändert (siehe Tabelle 5). Weder bei immunsuppressiver Dosis von CsA noch bei zusätzlicher Verabreichung von Theophyllin bei unilateral nephrektomierten Ratten wurde die glomeruläre Filtrationsrate (GFR), Elektrolytausscheidung oder die ausgeschiedene Urinmenge pro Zeiteinheit am 5. Tag nach Nephrektomie im Vergleich zu Ratten, die lediglich NaCl 0,85% erhielten, verändert (Tabelle 5).

Alle nierentransplantierten Ratten erhielten CsA in der Standarddosis zur Immunsuppression mit Theophyllin (KT-CT) oder mit Vehikel (KT-CV). Die Dauer der kalten Ischämiezeit der in University of Wisconsin Lösung aufbewahrten Transplantatnieren, das Körpergewicht der Ratten sowie das Nierengewicht waren in beiden Gruppen ähnlich (Tabelle 5). Ein ähnlich signifikanter Rückgang des MAP und des Hämatokrits wurde in beiden transplantierten Gruppen im Vergleich zu ihren jeweiligen Kontrollgruppen festgestellt (KT-CV vs. CON-CV bzw. KT-CT vs. CON-CT,  $p < 0,05$ , Tabelle 5). Natrium- und Kaliumkonzentrationen im Plasma waren in den transplantierten Gruppen und den jeweiligen Kontrollgruppen ähnlich (Tabelle 5).

Die GFR der Transplantatnieren war in der KT-CV-Gruppe am 5. postoperativen Tag im Vergleich zur CON-CV-Gruppe um 80% vermindert. Demgegenüber schwächte die Theophyllin-Behandlung die Verminderung der GFR in der KT-CT-Gruppe gegenüber der CON-CT-Gruppe auf 56% ab (Tabelle 5). Somit war die GFR in der KT-CT-Gruppe im Vergleich zur KT-CV-Gruppe um den Faktor 2 höher ( $p < 0,01$ , Tabelle 5, Abb. 15)

## ERGEBNISSE

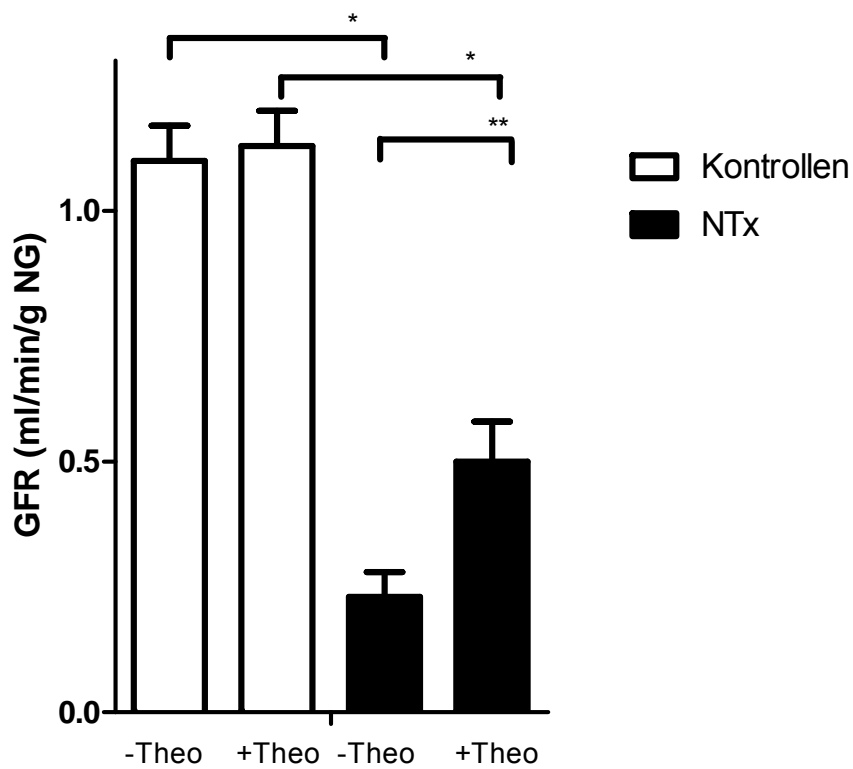
Die Urinausscheidung pro Zeiteinheit und fraktionierte Natrium- und Kaliumausscheidung ( $FE_{Na}$ ,  $FE_K$ ) waren in der KT-CV-Gruppe im Vergleich zur entsprechenden Kontrollgruppe CON-CV erhöht ( $p < 0,05$ , Tabelle 5), was auf ein tubuläres Elektrolyttransportdefizit schliessen lässt. Demgegenüber war die tubuläre Elektrolyttransportkapazität ( $FE_{Na}$ ,  $FE_K$ ) in der Gruppe mit Theophyllinbehandlung (KT-CT) bis zu den Werten der entsprechenden Kontrollgruppe (CON-CT) erhöht.

**Tab. 5:** Zusammenfassung der funktionellen Parameter in den verschiedenen Versuchsgruppen: unbehandelte, unilateral nephrektomierte Kontrollen (CON-VV), CsA-behandelte Kontrollen mit Vehikel (CON-CV), CsA- und Theophyllin-behandelte Kontrollen (CON-CT), nierentransplantierte Ratten mit CsA-Behandlung und Vehikel (KT-CV) und nierentransplantierte Ratten mit CsA- und Theophyllin-Behandlung (KT-CT). Werte in Mittelwert  $\pm$  SEM.

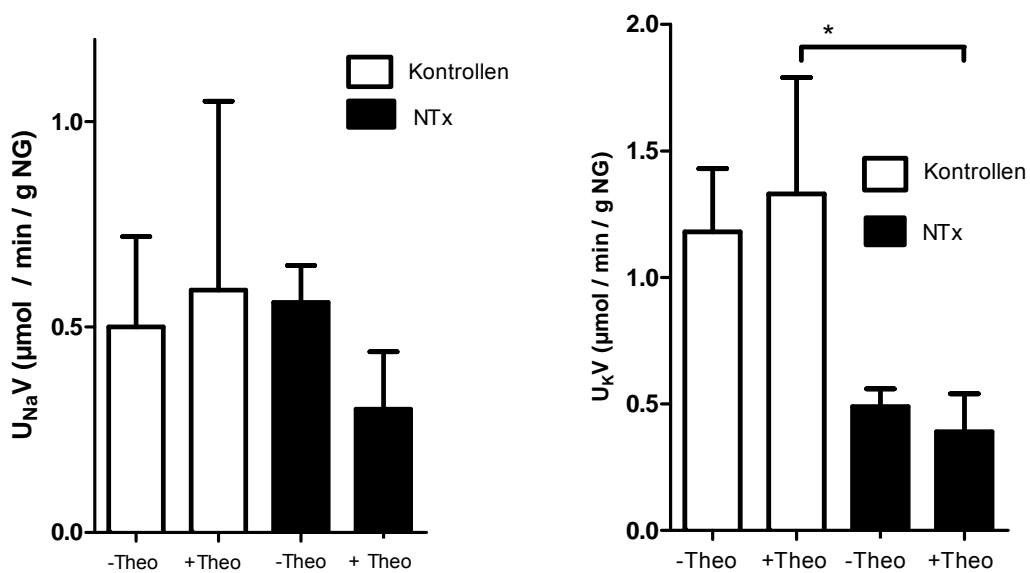
Variablen	CON-VV (n = 8)	CON-CV (n = 6)	CON-CT (n = 6)	KT-CV (n = 10)	KT-CT (n = 9)
Körpergewicht (KG) (g)	254 $\pm$ 9	276 $\pm$ 11	254 $\pm$ 10	263 $\pm$ 15	283 $\pm$ 12 <sup>c</sup>
Nierengewicht (g/100g KG)	1.11 $\pm$ 0.04	1.10 $\pm$ 0.02	1.03 $\pm$ 0.03	1.03 $\pm$ 0.03	1.10 $\pm$ 0.03
KIZ (min)	-	-	-	113 $\pm$ 14	101 $\pm$ 9
MAP (mmHg)	105.8 $\pm$ 3.2	98.1 $\pm$ 3.8	106.5 $\pm$ 6.9	81.0 $\pm$ 3.2 <sup>d</sup>	81.7 $\pm$ 3.0 <sup>c</sup>
Hkt (%)	45.8 $\pm$ 0.8	46.8 $\pm$ 1.2	46.3 $\pm$ 1.4	40.4 $\pm$ 1.7 <sup>d</sup>	43.7 $\pm$ 2.3
Na <sub>Plasma</sub> (mmol)	136.3 $\pm$ 2.1	139.3 $\pm$ 2.7	143.4 $\pm$ 3.4	138.9 $\pm$ 5.3	139.6 $\pm$ 4.7 <sup>c</sup>
K <sub>Plasma</sub> (mmol)	4.5 $\pm$ 0.2	5.2 $\pm$ 0.2 <sup>a</sup>	5.0 $\pm$ 0.0 <sup>a</sup>	5.3 $\pm$ 0.3	4.9 $\pm$ 0.3
GFR (ml/min/g NG)	1.12 $\pm$ 0.04	1.10 $\pm$ 0.07	1.13 $\pm$ 0.07	0.23 $\pm$ 0.05 <sup>d</sup>	0.50 $\pm$ 0.08 <sup>b,c</sup>
Urinausscheidung ( $\mu$ l/h/g NG)	10.05 $\pm$ 2.23	7.07 $\pm$ 1.11	8.51 $\pm$ 3.43	19.20 $\pm$ 3.9 <sup>d</sup>	11.80 $\pm$ 3.65
U <sub>Na</sub> V ( $\mu$ mol/min/g NG)	0.71 $\pm$ 0.21	0.50 $\pm$ 0.22	0.59 $\pm$ 0.46	0.56 $\pm$ 0.09	0.30 $\pm$ 0.14
FE <sub>Na</sub> (%)	0.43 $\pm$ 0.12	0.28 $\pm$ 0.13	0.31 $\pm$ 0.22	2.95 $\pm$ 0.77 <sup>d</sup>	0.62 $\pm$ 0.34 <sup>b</sup>
U <sub>K</sub> V ( $\mu$ mol/min/g NG)	1.37 $\pm$ 0.27	1.18 $\pm$ 0.25	1.33 $\pm$ 0.46	0.49 $\pm$ 0.07 <sup>d</sup>	0.39 $\pm$ 0.15 <sup>c</sup>
FE <sub>K</sub> (%)	32.88 $\pm$ 6.38	20.44 $\pm$ 4.44	23.67 $\pm$ 9.00	53.69 $\pm$ 9.78 <sup>d</sup>	18.92 $\pm$ 9.34 <sup>b</sup>

KT= Nierentransplantation, NG=Nierengewicht, KG=Körpergewicht, KIZ=kalte Ischämiezeit, U<sub>Na</sub>V= Urin-Natriumausscheidung, U<sub>K</sub>V= Urin-Kaliumausscheidung, FE<sub>Na</sub>=fraktionierte Natriumausscheidung, FE<sub>K</sub>=fraktionierte Kaliumausscheidung

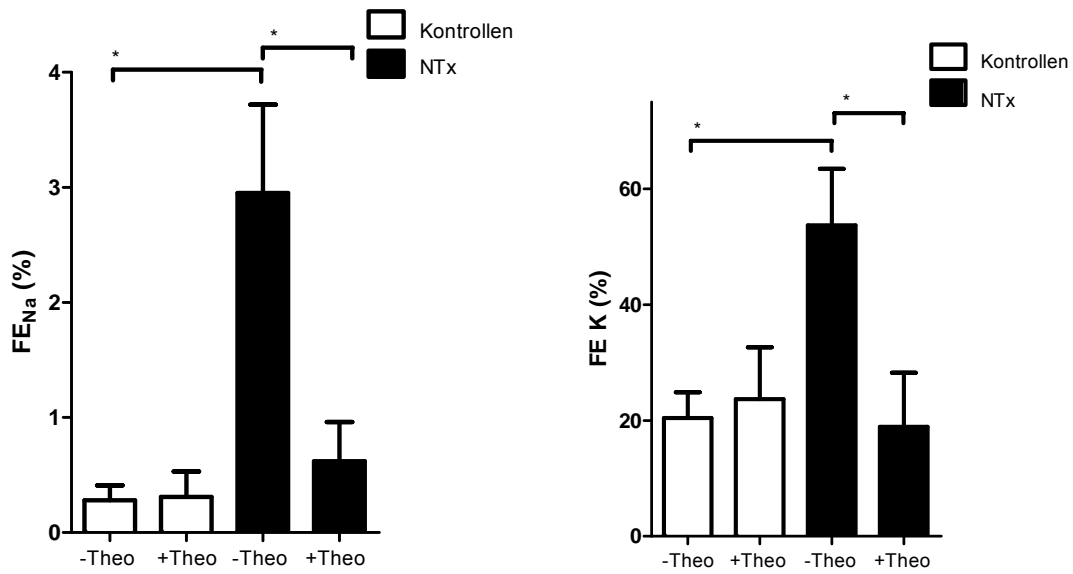
<sup>a</sup>p<0,05 vs. CON-VV, <sup>b</sup>p<0,05 vs. KT-CV, <sup>c</sup>p<0,05 vs. CON-CT, <sup>d</sup>p<0,05 vs. CON-CV



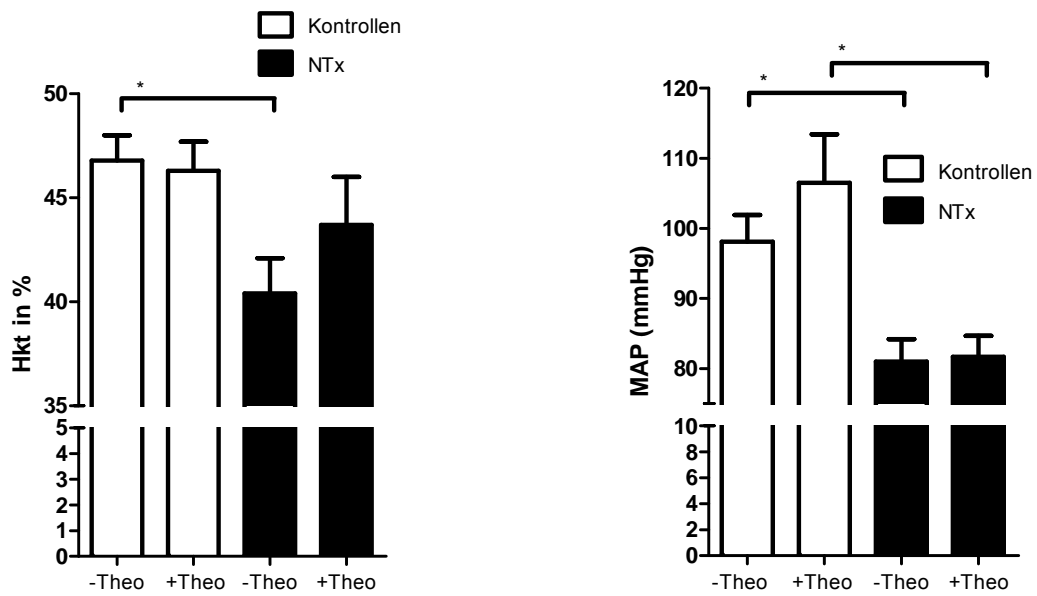
**Abb. 15:** GFR der Versuchsgruppen im Vergleich, signifikanter Unterschied in der GFR bei nierentransplantierten Ratten mit und ohne Theophyllin-Behandlung (\*  $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ )



**Abb. 16:**  $\text{Na}^+$  und  $\text{K}^+$ -Ausscheidung; signifikanter Unterschied in der  $\text{K}^+$ -Ausscheidung (\*  $p < 0,05$ )



**Abb. 17:** fraktionierte Elektrolytausscheidung; jeweils signifikante Unterschiede in FE<sub>Na</sub> und FE<sub>K</sub> (\*p<0,05)



**Abb. 18:** Vergleich der Hkt (Hämatokrit) - Werte während des Clearance-Versuchs (\*p<0,05)

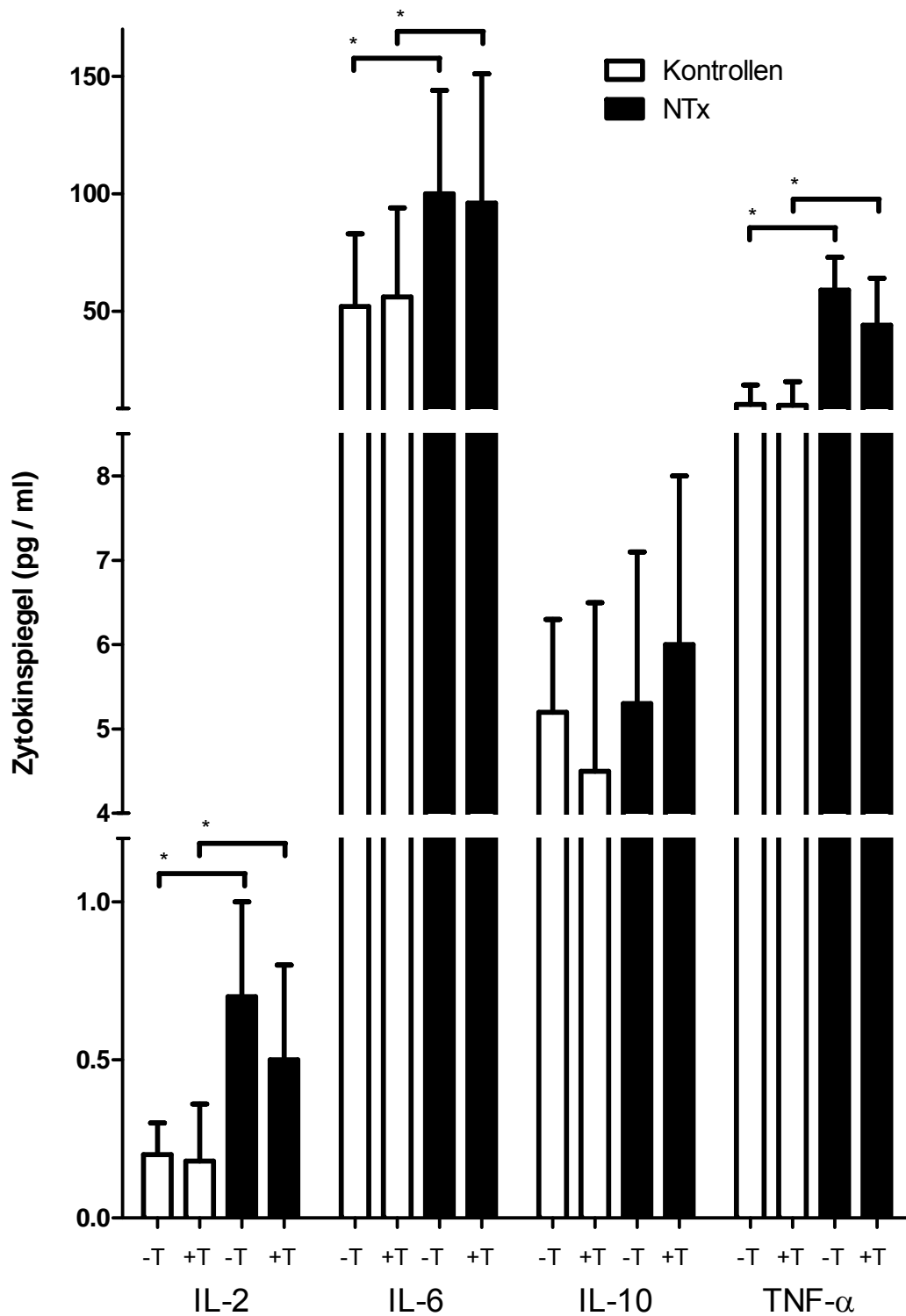
**Abb. 19:** Vergleich des MAP (mittlerer arterieller Druck) während des Clearance-Versuchs (\*p<0,05)

### 3.2 Zytokinkonzentrationen im Serum

Die Serumkonzentrationen der proinflammatorischen Zytokine waren bei Ratten nach Nierentransplantation (KT-CV, KT-CT) im Vergleich zu den jeweiligen Kontrollgruppen (CON-CV, CON-CT) signifikant erhöht, innerhalb der Transplantationsgruppen jedoch ähnlich: IL-2 ( $0,7 \pm 0,3$ ,  $0,5 \pm 0,3$  vs.  $0,2 \pm 0,1$ ,  $0,18 \pm 0,18$  pg/ml), IL-6 ( $100 \pm 44$ ,  $96 \pm 55$  vs.  $52 \pm 31$ ,  $56 \pm 38$  pg/ml), TNF- $\alpha$  ( $59 \pm 14$ ,  $44 \pm 20$  vs.  $10,4 \pm 8,2$ ,  $10 \pm 10$  pg/ml), wohingegen die Serumkonzentration des anti-inflammatorischen Zytokins IL10 ( $5,3 \pm 1,8$ ,  $6 \pm 2$  vs.  $5,2 \pm 1,1$ ,  $4,5 \pm 2$  pg/ml) weder innerhalb der Transplantationsgruppen noch im Vergleich zu den jeweiligen Kontrollen signifikant unterschiedlich war. Die Theophyllin-Behandlung beeinflusste somit weder die Serumkonzentration der pro- noch die Konzentration der anti-inflammatorischen Zytokine in nierentransplantierten Ratten. (Tabelle 6, Abb 20)

**Tab. 6:** Zytokinkonzentrationen in pg/ml

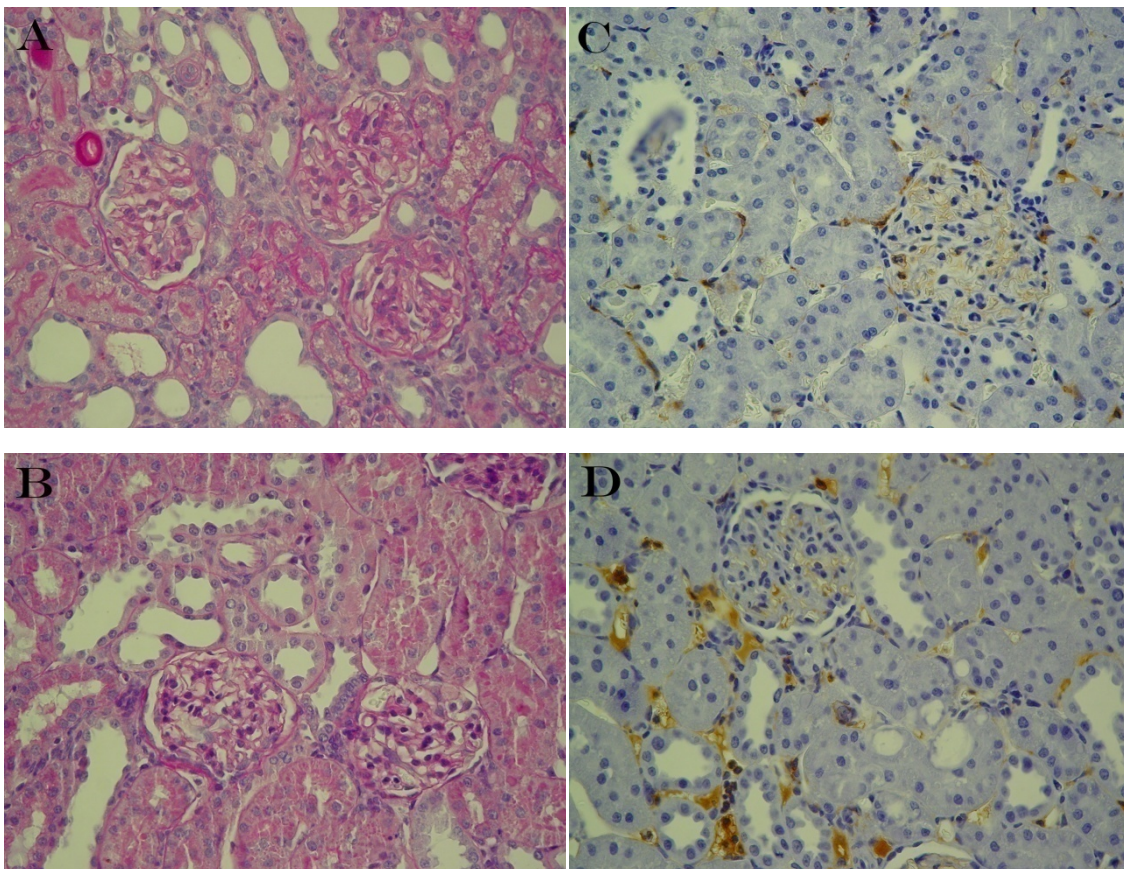
Zytokin	CON-CV (n=6)	CON-CT (n=6)	KT-CV (n=9)	KT-CT (n=10)
IL-2	$0,2 \pm 0,1$	$0,18 \pm 0,18$	$0,7 \pm 0,3$	$0,5 \pm 0,3$
IL-6	$52 \pm 31$	$56 \pm 38$	$100 \pm 44$	$96 \pm 55$
IL-10	$5,2 \pm 1,1$	$4,5 \pm 2$	$5,3 \pm 1,8$	$6 \pm 2$
TNF- $\alpha$	$10,4 \pm 8,2$	$10 \pm 10$	$59 \pm 14$	$44 \pm 20$



**Abb. 20:** Zytokinkonzentrationen im Serum; signifikant höhere Konzentrationen der proinflammatorischen Zytokine Interleukin 2 (IL-2), Interleukin 6 (IL-6), Tumornekrosefaktor alpha (TNF-α) in den Transplantatgruppen im Vergleich zu den jeweiligen Kontrollen; kein signifikanter Unterschied bei der Konzentration des antiinflammatorischen Interleukin 10 (IL-10) (\*p<0,05)

### 3.3 Histologische Untersuchungen

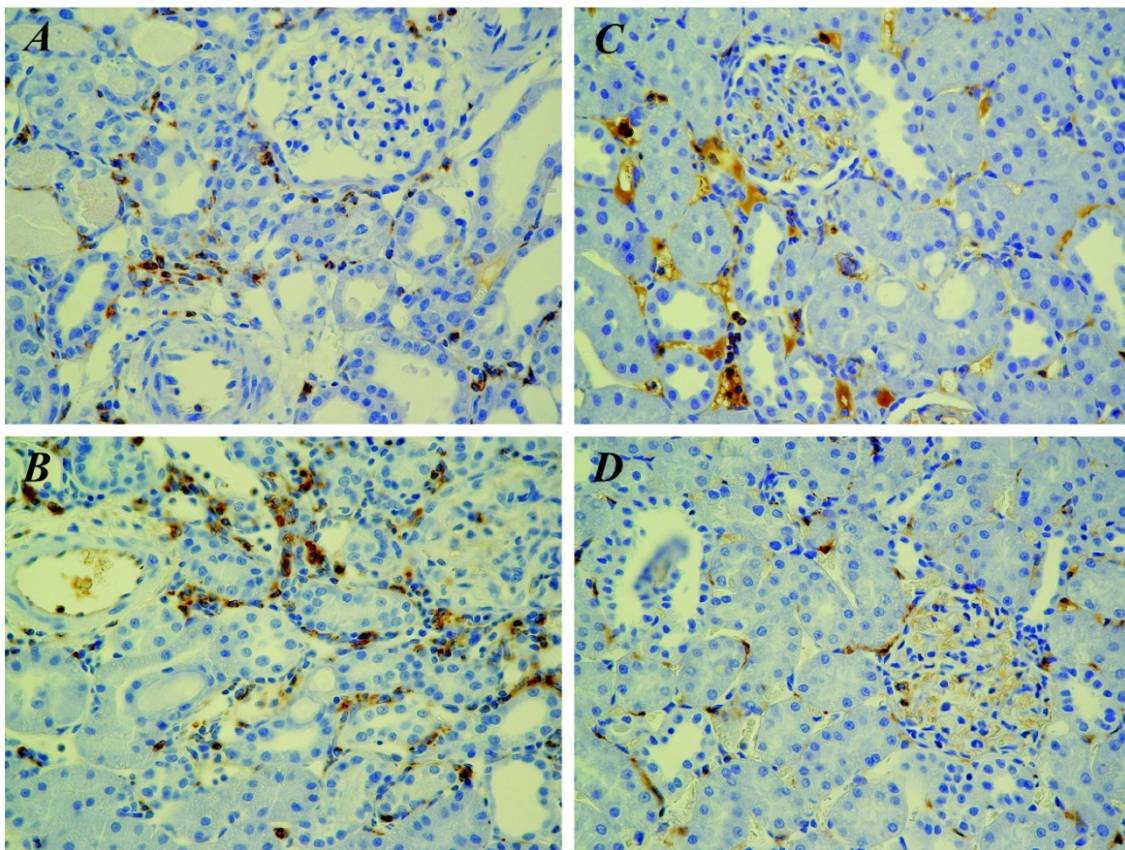
Nierentransplantierte Ratten mit und ohne Theophyllin-Behandlung (KT-CT, KT-CV) zeigten einen signifikanten glomerulären (G), tubulären (T) und vaskulären (V) Schaden ( G:  $1.44 \pm 0.29$  vs.  $1.3 \pm 0.26$ , T:  $1.22 \pm 0.15$  vs.  $1.7 \pm 0.45$ , V:  $1.67 \pm 0.67$  vs.  $2.0 \pm 0.58$ ) im Vergleich zu den entsprechenden Kontrollgruppen mit keinerlei G, T und V-Schaden ( $p < 0,05$ ). Unterschiedliche Ausprägungen von tubulärer Nekrose, glomerulärer Sklerose und vaskulärem Schaden konnten bei beiden nierentransplantierten Gruppen festgestellt werden. Diese Beobachtung stimmt mit den typischen heterogenen Auswirkungen von Ischämie-/ Reperfusionsschaden überein, wie sie nach Nierentransplantation festgestellt werden [31] (Abb. 21).



**Abb. 21:** Ähnliche Ausprägung des Ischämie-/ Reperfusionsschadens in beiden Transplantatgruppen in HE und PAS-Färbung (23A und 23C: KT-CT, 23B und 23D: KT-CV)

### 3.4 Immunhistochemische Analysen

In beiden nierentransplantierten Versuchsgruppen (KT-CV, KT-CT) zeigte sich ein ähnliches Ausmaß der Infiltration durch T-Lymphozyten (Score:  $1.6 \pm 0.48$  vs.  $0.89 \pm 0.35$ , Abb. 22, A, B) und Monozyten/Makrophagen (Score:  $1.6 \pm 0.31$  vs.  $1.0 \pm 0.17$ , Abb. 22, C, D). Gegenüber den entsprechenden Kontrollen (CON-CV, CON-CT) mit keinerlei Infiltration (Score 0) war sie erhöht. Die GFR bei nierentransplantierten Ratten zeigte keine Korrelation mit dem Grad der Infiltration.

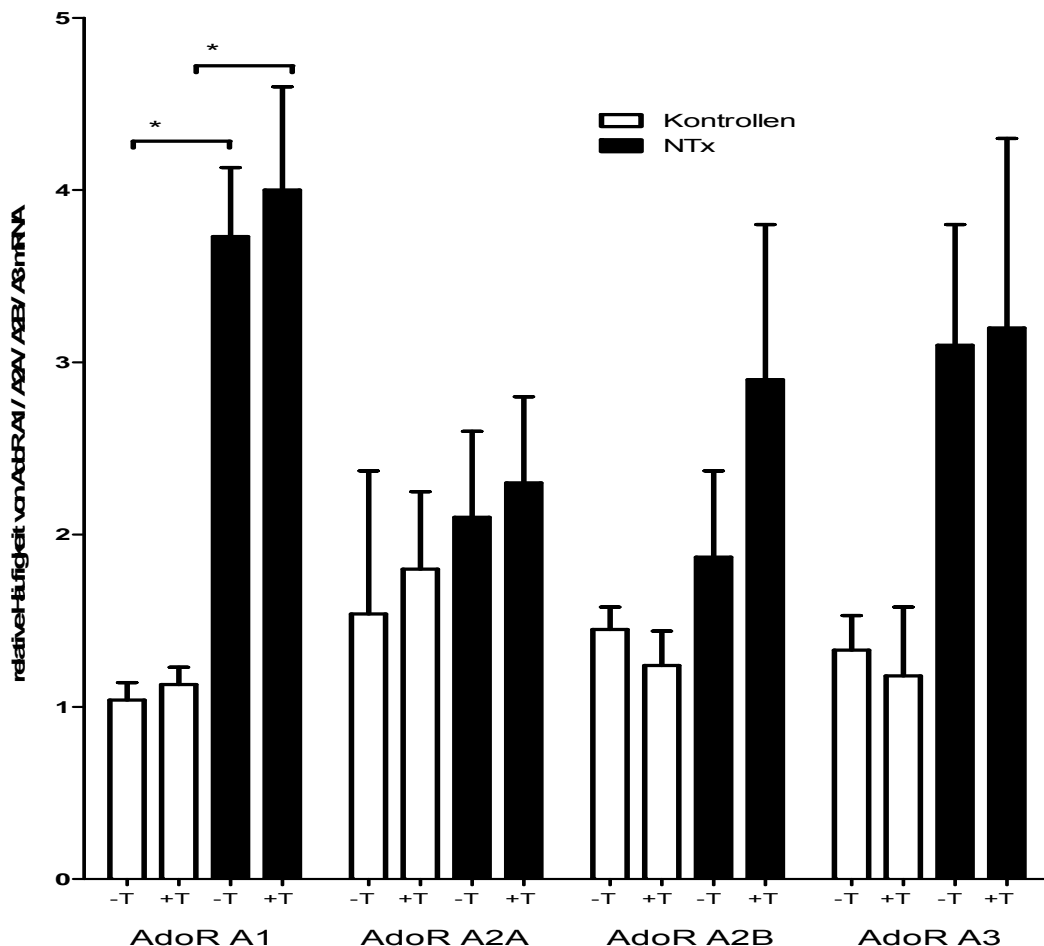


**Abb. 22:** Immunhistochemische Anfärbung von ED1-positiver Monozyten/Makrophagen und von T-Lymphozyten in transplantierten Nieren 5 Tage nach Transplantation, (A) Moderate interstitielle Infiltration ED1-positiver Monozyten/Makrophagen (Score 2) in der KT-CV-Gruppe, (B) Färbung wie in (A) in der KT-CT-Gruppe, (C) Infiltration von T-Lymphozyten in der KT-CV-Gruppe (Score 2), (D) Färbung wie in (C) mit geringer Infiltration von T-Lymphozyten in der KT-CT-Gruppe (Score 1)



### 3.5 Adenosinrezeptor (AdoR) mRNA Expression im Nierengewebe

Der Gehalt an renaler A1AR, A2AAR, A2BAR, A3AR mRNA wurde für alle Versuchsgruppen bestimmt und in Verhältnis zur unbehandelten Kontrollgruppe (CON-VV) gesetzt. In den Kontrollgruppen wurde die renale A1AR, A2AAR, A2BAR und A3AR mRNA-Expression weder durch CsA (CON-CV) noch durch Theophyllin-Behandlung (CON-CT) beeinflusst (Abb. 23) Bei den nierentransplantierten Ratten (KT-CV, KT-CT) zeigte sich jedoch eine signifikante Erhöhung der A1AR mRNA-Expression verglichen mit den entsprechenden Kontrollgruppen (CON-CV, CON-CT,  $p < 0,05$ , Abb.23), während sich die A2AAR, A2BAR und A3AR mRNA-Expression nicht signifikant veränderte.



**Abb. 23:** A1AR-, A2AAR-, A2BAR-und A3AR-mRNA-Expression. Expression von A1AR-mRNA war nach Transplantation signifikant erhöht ( $*p < 0,05$ ), wohingegen die Expression der anderen AdoR mRNAs keine signifikanten Unterschiede zeigte. Die Expression der AdoRs war durch Theophyllin nicht beeinflusst. (-T = ohne Theophyllin, +T= mit Theophyllin, AdoR=Adenosinrezeptor, mRNA=messenger RNA)

### 4. Diskussion

Experimentelle und klinische Studien haben gezeigt, dass Adenosinrezeptor-Antagonisten wie Xanthinderivate (z. B. Theophyllin) das Ausmaß des akuten Nierenversagens reduzieren oder verhindern können. Aufgrund dieser Beobachtungen wurde die Hypothese aufgestellt, dass der positive Effekt von Theophyllin in verschiedenen Modellen des akuten Nierenversagens auch beim Ischämie- / Reperfusionsschaden nach Nierentransplantation eintritt. Diese Studie zeigt in einem Modell der allogenen Nierentransplantation an der Ratte, dass die Behandlung mit Theophyllin während und nach Transplantation die glomeruläre Filtrationsrate (GFR) am 5. postoperativen Tag verbessert. Theophyllin hatte weder Einfluss auf histologische Entzündungszeichen noch auf die Zytokinmuster im Serum. Der Anstieg von A1AR mRNA-Expression stellt möglicherweise einen wichtigen Faktor dar, der zur verzögerten Transplantatfunktion beiträgt.

#### 4.1 Methode / CsA- und Theophyllinspiegel

Um die funktionellen und immunologischen Auswirkungen des Ischämie-/ Reperfusionsschadens mit und ohne Theophyllinbehandlung auf das Transplantat zu untersuchen, wurde das gut etablierte Modell der Nierentransplantation von Fisher 344 auf Lewis Ratten verwendet. Es wurde eine kalte Ischämiezeit von zwei Stunden gewählt, die warme Ischämiezeit betrug zwischen 30 und 45 Minuten. Frühere Studien von Dragun et al. haben belegt, dass eine lange kalte Ischämiezeit (12 - 24 Stunden) im Vergleich mit einer kurzen kalten Ischämiezeit (2 – 6 Stunden) keine weitere funktionelle Verschlechterung des Transplantates bewirkt [32]. In derselben Studie wurde gezeigt, dass der Spitzenwert der Infiltration immunkompetenter Zellen in das Transplantat zwischen 48 Stunden und einer Woche nach Transplantation auftrat. Während desselben Zeitraums begann die Nierenfunktion wieder anzusteigen [32]. Deshalb wurde der 5. postoperative Tag als kritischer

Zeitpunkt gewählt, um sowohl die Nierenfunktion (GFR und Elektrolytausscheidung) als auch die Infiltration immunkompetenter Zellen in das Transplantat zu erfassen. Theophyllin- und CsA-Spiegel wurden bei Kontrollratten bestimmt, um mögliche Wechselwirkungen nachzuweisen. Beim Menschen sind für die Cytochrom P-450-abhängige Metabolisierung von CsA und Theophyllin keine Interaktionen nachgewiesen worden [29, 40].

#### **4.2 Transplantatfunktion**

Diese Studie zeigt, dass Theophyllin-behandelte Ratten eine um den Faktor 2 höhere GFR im Vergleich zur Kontrollgruppe am 5. postoperativen Tag nach Nierentransplantation aufwiesen. Munger et al. wiesen in einem allogenen Modell zur Nierentransplantation an Ratten ohne CsA-Behandlung einen zu dieser Studie ähnlichen Rückgang der GFR um 80% nach. Die Autoren vermuteten, dass dieser Abfall der GFR Ergebnis der präglomerulären Vasokonstriktion war [84]. Da Adenosin eine Vasokonstriktion in den afferenten glomerulären Arteriolen der Niere in vivo bewirkt, die einen Abfall des glomerulären hydrostatischen Drucks und folglich einen Abfall der GFR nach sich zieht [51, 102] ist es vorstellbar, dass der hämodynamische Effekt von Theophyllin hauptsächlich in den präglomerulären Widerstandsgefäßen erzielt wird. Die halbmaximale Inhibition von adenosininduzierter Vasokonstriktion durch Theophyllin wird bei 2-5  $\mu\text{mol/l}$  beobachtet [92]. Diese Konzentration befindet sich innerhalb des therapeutischen Fensters, daher ist es unwahrscheinlich, dass Theophyllin in dieser Konzentration durch Inhibition von Phosphodiesterasen diese renalen Effekte hervorruft. Diese Schlussfolgerung wird weiter durch die Beobachtung gestützt, dass die renalen Effekte von Theophyllin in A1AR knock-out Mäusen nicht auftreten [118]. Zusätzlich blockieren Theophyllin und A1AR-Antagonisten die tubuloglomeruläre Feedback Antwort des Nephrons [97]. Das tubuloglomeruläre Feedback (TGF) beschreibt den Ablauf der Signalprozesse, mittels derer die glomeruläre Filtrationsrate des einzelnen Nephrons abnimmt, wenn die Elektrolytkonzentration (Na, K, Cl) in der Tubulusflüssigkeit, die das Macula

densa Segment passiert, erhöht ist [139]. Adenosin wird als Hauptmediator des TGF angesehen [96, 130, 135]. Des Weiteren wird das TGF als wichtiger Faktor in der Pathogenese verschiedener Arten des akuten Nierenversagens angesehen [104]. Somit ist es wahrscheinlich, dass die Verbesserung der GFR durch Theophyllin bei Ratten nach Nierentransplantation durch A1AR-Antagonismus vermittelt wird. Weitere Mechanismen, die zum positiven Effekt des Theophyllins auf das Transplantat beitragen, können jedoch nicht ausgeschlossen werden.

Neben der erhöhten GFR bewirkte Theophyllin einen Anstieg der Elektrolytresorptionskapazität des Nephrons, erkennbar durch den Abfall der fraktionierten Elektrolytausscheidung (Tabelle 5). Diese Verbesserung der tubulären Elektrolytresorption durch Theophyllin im Vergleich zu der Kontrollgruppe (KT-CV) könnte aus der verbesserten renalen Mikrozirkulation resultieren, wodurch die Tubuli mit mehr Sauerstoff und Substrat versorgt wurden und somit eine höhere Transportleistung erzielen konnten. Der durch Theophyllin verursachte Anstieg des Elektrolyttransports in der Nierentransplantationsgruppe mit Theophyllinbehandlung (KT-CT) ist mit der Elektrolytausscheidung der Kontrollgruppe (CON-CT) vergleichbar.

### **4.3 Nierenhistologie und Zytokinkonzentrationen**

Die histologische Auswertung zeigte eine typische Nierenmorphologie nach Transplantation [32]. Theophyllin bewirkte weder eine Veränderung der Nierenmorphologie noch des Grades der Infiltration von Monozyten/Makrophagen und T-Lymphozyten in das Transplantat (KT-CT). Die Zytokinverteilung im Serum war im Vergleich zur Kontrollgruppe durch Theophyllin ebenfalls unbeeinflusst. Adenosin kann die Freisetzung von Zytokinen sowohl aus inflammatorischen Zellen als auch aus Gewebsendothelzellen bewirken, die Freisetzung von proinflammatorischen Zytokinen wird gesenkt, die von antiinflammatorischen Zytokinen gesteigert [21]. Die über den Adenosinrezeptor A2A vermittelte, antiinflammatorische Wirkung von Adenosin durch die Reduktion der Einwanderung von Neutrophilen

bei Nieren, die dem Ischämie-/ Reperfusionsschaden ausgesetzt waren wurde als protektiv angesehen [90]. Des Weiteren wurde gezeigt, dass die durch Ischämie-/ Reperfusionsschaden verursachte, A2AAR vermittelte Erhöhung von IL-6, IL-1 $\beta$ , IL-1-Rezeptorantagonist und TGF- $\beta$  mRNA in der Niere reduziert [91]. Demnach sollte A2AAR-Antagonismus durch Theophyllin eigentlich zu einer proinflammatorischen Reaktion führen, die in diesen Experimenten jedoch nicht nachgewiesen werden konnte. Diese könnte jedoch durch den immunsuppressiven Effekt von CsA maskiert werden.

#### **4.4 Renale Adenosinrezeptor mRNA**

Studien belegen die biologisch wichtige Rolle von Adenosinrezeptoren bei der präglomerulären Mikrozirkulation in Hinblick auf Regulation des renalen Blutflusses und des renalen Gefäßwiderstandes [60], der GFR [103], der Reninsekretion [85, 108], des TGF [129, 135] und der Reaktion der Nierengefäße auf Angiotensin II [142]. Es konnten Unterschiede in der Verteilung der einzelnen Adenosinrezeptorproteine und der mRNA innerhalb der Niere nachgewiesen werden, das Vorkommen von A1- und A2B Rezeptoren und –mRNA war in präglomerulären Mikrogefäßen deutlich höher, wohingegen A2A- und A3-Rezeptoren und –mRNA in präglomerulären Mikrogefäßen kaum nachweisbar waren [61]. Die beobachtete Hochregulation von A1AR mRNA in den Transplantaten spricht für eine maßgebliche Rolle von Adenosin in der Pathogenese des Ischämie-/ Reperfusionsschadens nach Nierentransplantation. Diese Ergebnisse können als Nachweis für eine präglomeruläre Vasokonstriktion durch Adenosin angesehen werden und könnten den protektiven Effekt von Adenosinrezeptorantagonisten, wie z.B. Theophyllin, in verschiedenen Modellen des akuten Nierenversagens erklären [104].

Die Nebenwirkungen von Theophyllin sind durch den langjährigen klinischen Gebrauch bekannt und dokumentiert. Theophyllin wird hauptsächlich zur Behandlung obstruktiver Lungenerkrankungen eingesetzt. Da Theophyllin hauptsächlich hepatisch metabolisiert wurde, hat eine

## DISKUSSION

---

Nierenfunktionseinschränkung keinen Einfluß auf die Theophyllinkonzentrationen im Plasma. Das Auftreten von schweren, durch Theophyllin verursachten Nebenwirkungen innerhalb von Plasmaspiegeln von 5 – 16 µmol/l unwahrscheinlich (DrugDex database)

## 5. Zusammenfassung und Schlußfolgerung

Ischämie- und Reperfusionsschäden (I/R-Schäden) bei der humanen Nierentransplantation können Ursache einer verzögerten Funktionsaufnahme bis hin zum initialen Transplantatversagen sein. Die Faktoren, die zum I/R-Schaden der Niere führen, sind unvollständig aufgeklärt. Ein Faktor, der in der Niere bei Ischämie aus dem ATP Abbau entsteht, ist das Adenosin. Es führt in der Niere über eine präglomeruläre Vasokonstriktion und eine postglomeruläre Dilatation zu einem Abfall der glomerulären Filtrationsrate und kann, insbesondere bei Ischämie, zur Entstehung des akuten Nierenversagens beitragen, wie zahlreiche tierexperimentelle Studien belegt haben. In der vorliegenden Studie soll durch Blockade der Adenosinrezeptoren mit dem unselektiven kompetitiven Adenosinrezeptorantagonisten Theophyllin die Inzidenz des initialen Transplantatversagens reduziert und die Transplantatfunktion erhalten werden.

Am 5. postoperativen Tag nach Nierentransplantation wurde eine  $^3\text{[H]}$ -Inulin-Clearance zur Erfassung der Transplantatfunktion mit und ohne Theophyllinbehandlung durchgeführt. Neben Messung der funktionellen Parameter wie GFR und Elektrolytausscheidung wurden die Transplantate nach Abschluss der Versuche histologisch und Immunhistochemisch untersucht, die Zytokinkonzentrationen im Serum sowie die Expression von Adenosinrezeptor-mRNA gemessen.

Die Ergebnisse lassen sich wie folgt zusammenfassen:

1. Die GFR ist unter Behandlung mit Theophyllin im Vergleich zur Kontrollgruppe ohne Theophyllinbehandlung am 5. postoperativen Tag signifikant höher ( $p < 0,01$ ).
2. Die fraktionierte Elektrolytausscheidung ist in der KT-CT-Gruppe gegenüber der KT-CV-Gruppe signifikant niedriger.

3. Sowohl die histologischen als auch die immunhistochemischen Befunde der Transplantate zeigten keinen signifikanten Unterschied im Ausmaß der tubulären Nekrose, der glomerulären Sklerose und des vaskulären Schadens. Auch die Infiltration der transplantierten Nieren durch immunkompetente Zellen war ähnlich.
4. Die A1AR mRNA ist am 5. postoperativen Tag hochreguliert.

Die vorliegende Studie zeigt eine signifikante Verbesserung der GFR und der tubulären Elektrolytresorptionsfähigkeit des Transplantats nach Gabe von Theophyllin. Dieser Theophyllin-Effekt ging nicht einher mit einer unterschiedlich starken Entzündungsreaktion in den beiden Gruppen. Der Anstieg der A1AR mRNA im Transplantat lässt vermuten, dass der A1AR eine wichtige Rolle bei dem protektiven Effekt von Theophyllin spielt.



## 6. Literaturverzeichnis

1. Agmon, Y., D. Dinour, and M. Brezis, *Disparate effects of adenosine A1- and A2-receptor agonists on intrarenal blood flow*. Am J Physiol, 1993. **265**(6 Pt 2): p. F802-6.
2. Albinus, M., et al., *Isolated superfused juxtaglomerular cells from rat kidney: a model for study of renin secretion*. Am J Physiol, 1998. **275**(6 Pt 2): p. F991-7.
3. Arend, L.J., et al., *Role for intrarenal adenosine in the renal hemodynamic response to contrast media*. J Lab Clin Med, 1987. **110**(4): p. 406-11.
4. Arend, L.J., et al., *Adenosine-induced decrease in renin release: dissociation from hemodynamic effects*. Am J Physiol, 1984. **247**(3 Pt 2): p. F447-52.
5. Arend, L.J., et al., *Elevation of intrarenal adenosine by maleic acid decreases GFR and renin release*. Kidney Int, 1986. **30**(5): p. 656-61.
6. Arend, L.J., C.I. Thompson, and W.S. Spielman, *Dipyridamole decreases glomerular filtration in the sodium-depleted dog. Evidence for mediation by intrarenal adenosine*. Circ Res, 1985. **56**(2): p. 242-51.
7. Azuma, H., et al., *Cellular and molecular predictors of chronic renal dysfunction after initial ischemia/reperfusion injury of a single kidney*. Transplantation, 1997. **64**(2): p. 190-7.
8. Baumstark, C., et al., *Intracellular Ca<sup>2+</sup> regulation in hepatocytes under experimental transplantation conditions*. Transpl Int, 2002. **15**(5): p. 233-9.
9. Beavo, J.A., et al., *Effects of xanthine derivatives on lipolysis and on adenosine 3',5'-monophosphate phosphodiesterase activity*. Mol Pharmacol, 1970. **6**(6): p. 597-603.
10. Benoehr, P., Krueth, P., Hartmann, J.T., Grenz, A., Osswald, H., Mueller, G.A., *Nephroprotective effect of theophylline during standard dose cisplatin chemotherapy*. JASN, 2002. **13**: p. 323A.

11. Berne, R.M., et al., *Adenosine in the local regulation of blood flow: a brief overview*. Fed Proc, 1983. **42**(15): p. 3136-42.
12. Bianchi, C.P., *The effect of caffeine on radiocalcium movement in frog sartorius*. J. Gen. Physiol, 1961. **44**: p. 845-858.
13. Bidani, A.K. and P.C. Churchill, *Aminophylline ameliorates glycerol-induced acute renal failure in rats*. Can J Physiol Pharmacol, 1983. **61**(6): p. 567-71.
14. Bidani, A.K., P.C. Churchill, and W. Packer, *Theophylline-induced protection in myoglobinuric acute renal failure: further characterization*. Can J Physiol Pharmacol, 1987. **65**(1): p. 42-5.
15. Blayney, L., et al., *Action of caffeine on calcium transport by isolated fractions of myofibrils, mitochondria, and sarcoplasmic reticulum from rabbit heart*. Circ Res, 1978. **43**(4): p. 520-6.
16. Blinks, J.R., et al., *Influence of caffeine and other methylxanthines on mechanical properties of isolated mammalian heart muscle. Evidence for a dual mechanism of action*. Circ Res, 1972. **30**(4): p. 367-92.
17. Bohle, A., et al., *Acute renal failure in man: new aspects concerning pathogenesis. A morphometric study*. Am J Nephrol, 1990. **10**(5): p. 374-88.
18. Booth, N.H., *Drugs acting on the central nervous system*. Veterinary pharmacology and therapeutics, ed. L. Meyer Jones, Booth, N. H., McDonald, L. E. 1977, Ames, Iowa: Iowa State University Press. 413.
19. Borel, J.F., *From our laboratories: cyclosporin A*. Triangle, 1981. **20**(3): p. 97-105.
20. Borel, J.F., et al., *Biological effects of cyclosporin A: a new antilymphocytic agent*. Agents Actions, 1976. **6**(4): p. 468-75.
21. Bouma, M.G., F.A. van den Wildenberg, and W.A. Buurman, *Adenosine inhibits cytokine release and expression of adhesion molecules by activated human endothelial cells*. Am J Physiol, 1996. **270**(2 Pt 1): p. C522-9.
22. Bowmer, C.J., M.G. Collis, and M.S. Yates, *Effect of the adenosine antagonist 8-phenyltheophylline on glycerol-induced acute renal failure in the rat*. Br J Pharmacol, 1986. **88**(1): p. 205-12.

23. Brown, R., et al., *Abolished tubuloglomerular feedback and increased plasma renin in adenosine A1 receptor-deficient mice*. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2001. **281**(5): p. R1362-7.
24. Butcher, R.W. and E.W. Sutherland, *Adenosine 3',5'-phosphate in biological materials. I. Purification and properties of cyclic 3',5'-nucleotide phosphodiesterase and use of this enzyme to characterize adenosine 3',5'-phosphate in human urine*. *J Biol Chem*, 1962. **237**: p. 1244-50.
25. Calne, R.Y., *The rejection of renal homografts: Inhibition in dogs by 6-mercaptoprine*. *Lancet*, 1960. **1**: p. 417-418.
26. Chapman, R.A., Tunstall, J., *Pharmacology of calcium uptake and release from the sarcoplasmic reticulum: sensitivity to methylxanthines and ryanodine*. *Handbook of Experimental Pharmacology: Calcium in Drug Actions*, ed. P.F. Baker. 1988, Berlin: Springer-Verlag. 199-216.
27. Chou, C.C. and T.W. Vickroy, *Antagonism of adenosine receptors by caffeine and caffeine metabolites in equine forebrain tissues*. *Am J Vet Res*, 2003. **64**(2): p. 216-24.
28. Churchill, P.C. and M.C. Churchill, *A1 and A2 adenosine receptor activation inhibits and stimulates renin secretion of rat renal cortical slices*. *J Pharmacol Exp Ther*, 1985. **232**(3): p. 589-94.
29. Dai, Y., et al., *In vitro metabolism of cyclosporine A by human kidney CYP3A5*. *Biochem Pharmacol*, 2004. **68**(9): p. 1889-902.
30. Daly, J.W., R.F. Bruns, and S.H. Snyder, *Adenosine receptors in the central nervous system: relationship to the central actions of methylxanthines*. *Life Sci*, 1981. **28**(19): p. 2083-97.
31. Dragun, D., et al., *Ischemia-reperfusion injury in renal transplantation is independent of the immunologic background*. *Kidney Int*, 2000. **58**(5): p. 2166-77.
32. Dragun, D., et al., *Prolonged cold preservation augments vascular injury independent of renal transplant immunogenicity and function*. *Kidney Int*, 2001. **60**(3): p. 1173-81.
33. Druml, W., *The beginning of organ transplantation: Emerich Ullmann (1861-1937)*. *Wien Klin Wochenschr*, 2002. **114**(4): p. 128-37.
34. Edlund, A., H. Ohlsen, and A. Sollevi, *Renal effects of local infusion of adenosine in man*. *Clin Sci (Lond)*, 1994. **87**(2): p. 143-9.

35. El-Wahsh, M., *Liver graft preservation: an overview*. Hepatobiliary Pancreat Dis Int, 2007. **6**(1): p. 12-6.
36. Elion, G.B., Hitchings, G. H., *The Chemistry and Biology of Purines*. 1. Aufl. ed. 1957, Boston: Little, Brown & Co.
37. Erley, C.M., et al., *Prevention of radiocontrast-media-induced nephropathy in patients with pre-existing renal insufficiency by hydration in combination with the adenosine antagonist theophylline*. Nephrol Dial Transplant, 1999. **14**(5): p. 1146-9.
38. Erley, C.M., et al., *Adenosine antagonist theophylline prevents the reduction of glomerular filtration rate after contrast media application*. Kidney Int, 1994. **45**(5): p. 1425-31.
39. Erley, C.M., et al., *Prevention of radiocontrast-induced nephropathy by adenosine antagonists in rats with chronic nitric oxide deficiency*. J Am Soc Nephrol, 1997. **8**(7): p. 1125-32.
40. Faber, M.S. and U. Fuhr, *Time response of cytochrome P450 1A2 activity on cessation of heavy smoking*. Clin Pharmacol Ther, 2004. **76**(2): p. 178-84.
41. Fredholm, B.B., *Adenosine, adenosine receptors and the actions of caffeine*. Pharmacol. Toxicol., 1995. **76**: p. 93-101.
42. Fredholm, B.B., et al., *Nomenclature and classification of purinoceptors*. Pharmacol Rev, 1994. **46**(2): p. 143-56.
43. Fredholm, B.B., et al., *Actions of caffeine in the brain with special reference to factors that contribute to its widespread use*. Pharmacol Rev, 1999. **51**(1): p. 83-133.
44. Fredholm, B.B., Ijzerman, A., Jacobsen, K. A., Linden, J., Stiles, G. L., *The IUPHAR compendium of receptor characterisation and classification*. IUPHAR Media, ed. D. Girdlestone. 1998, London. 48-57.
45. Fredholm, B.B. and C.G. Persson, *Xanthine derivatives as adenosine receptor antagonists*. Eur J Pharmacol, 1982. **81**(4): p. 673-6.
46. Fredholm, B.B. and A. Sydbom, *Are the anti-allergic actions of theophylline due to antagonism at the adenosine receptor*. Agents Actions, 1980. **10**(1 Pt 2): p. 145-7.

47. Gerkens, J.F., et al., *Effect of aminophylline on amphotericin B nephrotoxicity in the dog*. J Pharmacol Exp Ther, 1983. **224**(3): p. 609-13.
48. Gouyon, J.B. and J.P. Guignard, *Theophylline prevents the hypoxemia-induced renal hemodynamic changes in rabbits*. Kidney Int, 1988. **33**(6): p. 1078-83.
49. Graham, T.E., J.W. Rush, and M.H. van Soeren, *Caffeine and exercise: metabolism and performance*. Can J Appl Physiol, 1994. **19**(2): p. 111-38.
50. Grenz, A., et al., *Protective Role of Ecto-5'-Nucleotidase (CD73) in Renal Ischemia*. J Am Soc Nephrol, 2007. **18**(3): p. 833-845.
51. Haas, J.A. and H. Osswald, *Adenosine induced fall in glomerular capillary pressure. Effect of ureteral obstruction and aortic constriction in the Munich-Wistar rat kidney*. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol, 1981. **317**(1): p. 86-9.
52. Heidemann, H.T., et al., *Effect of aminophylline on renal vasoconstriction produced by amphotericin B in the rat*. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol, 1983. **324**(2): p. 148-52.
53. Heidemann, H.T., et al., *Effect of aminophylline on cisplatin nephrotoxicity in the rat*. Br J Pharmacol, 1989. **97**(2): p. 313-8.
54. Helmiger, J., *Das experimentell erzeugte akute ischämische Nierenversagen bei der Ratte*, in *Medicine Faculty*. 1979, RWTH Aachen: Aachen.
55. Heyne, N., Benoehr, P., Muhlbauer, B., Delabar, U., Risler, T., Osswald, H., *Physiological regulation of urinary adenosine excretion in healthy volunteers (Abstract)*. Kidney Blood Press Res., 1999. **22**: p. 281.
56. Ishikawa, I., N. Shikura, and K. Takada, *Amelioration of glycerol-induced acute renal failure in rats by an adenosine A1 receptor antagonist (FR-113453)*. Ren Fail, 1993. **15**(1): p. 1-5.
57. Ito, Y., H. Suzuki, and H. Kuriyama, *Effects of caffeine and procaine on the membrane and mechanical properties of the smooth muscle cells of the rabbit main pulmonary artery*. Jpn J Physiol, 1977. **27**(4): p. 467-81.
58. Jackson, E.K., *Adenosine: a physiological brake on renin release*. Annu Rev Pharmacol Toxicol, 1991. **31**: p. 1-35.

59. Jackson, E.K., *Renal actions of Purines*. Purinergic Approaches in Experimental therapeutics, ed. K.A. Jacobson, Jarvis, M. F. 1997: Wiley-Liss, Inc. 217-250.
60. Jackson, E.K., *P1 and P2 receptors in the renal system*. Handbook of Experimental Pharmacology, Purinergic and Pyrimidinerpic Signalling II: Cardiovascular, Respiratory, Immune, Metabolic and Gastrointestinal Tract Function, ed. M.P. Abbracchio, Williams, M. Vol. 151/II. 2001, Berlin: Springer-Verlag. 33-71.
61. Jackson, E.K., C. Zhu, and S.P. Tofovic, *Expression of adenosine receptors in the preglomerular microcirculation*. Am J Physiol Renal Physiol, 2002. **283**(1): p. F41-51.
62. Johnson, P.N. and G. Inesi, *The effect of methylxanthines and local anesthetics on fragmented sarcoplasmic reticulum*. J Pharmacol Exp Ther, 1969. **169**(2): p. 308-14.
63. Kahan, B.D., *Pien Ch'iao, the legendary exchange of hearts, traditional Chinese medicine, and the modern era of cyclosporine*. Transplant Proc, 1988. **20**(2 Suppl 2): p. 2-12.
64. Kahan, B.D., et al., *Immunosuppressive effects and safety of a sirolimus/cyclosporine combination regimen for renal transplantation*. Transplantation, 1998. **66**(8): p. 1040-6.
65. Katholi, R.E., et al., *Nephrotoxicity from contrast media: attenuation with theophylline*. Radiology, 1995. **195**(1): p. 17-22.
66. Kellett, R., et al., *Amelioration of glycerol-induced acute renal failure in the rat with 8-cyclopentyl-1,3-dipropylxanthine*. Br J Pharmacol, 1989. **98**(3): p. 1066-74.
67. Kloor, D., et al., *Tissue levels of S-adenosylhomocysteine in the rat kidney: effects of ischemia and homocysteine*. Biochem Pharmacol, 2002. **63**(4): p. 809-15.
68. Kloor, D., et al., *S-adenosylhomocysteine-hydrolase from bovine kidney: enzymatic and binding properties*. Kidney Blood Press Res, 1996. **19**(2): p. 100-8.
69. Knight, R.J., C.J. Bowmer, and M.S. Yates, *Effect of the selective A1 adenosine antagonist 8-cyclopentyl-1,3-dipropylxanthine on acute renal dysfunction induced by Escherichia coli endotoxin in rats*. J Pharm Pharmacol, 1993. **45**(11): p. 979-84.

70. Kuan, C.J., J.N. Wells, and E.K. Jackson, *Endogenous adenosine restrains renin release in conscious rats*. *Circ Res*, 1990. **66**(3): p. 637-46.
71. Lee, H.T. and C.W. Emala, *Protective effects of renal ischemic preconditioning and adenosine pretreatment: role of A(1) and A(3) receptors*. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2000. **278**(3): p. F380-7.
72. Lee, H.T. and C.W. Emala, *Systemic adenosine given after ischemia protects renal function via A(2a) adenosine receptor activation*. *Am J Kidney Dis*, 2001. **38**(3): p. 610-8.
73. Lee, H.T. and C.W. Emala, *Adenosine attenuates oxidant injury in human proximal tubular cells via A(1) and A(2a) adenosine receptors*. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2002. **282**(5): p. F844-52.
74. Lee, H.T., et al., *A3 adenosine receptor knockout mice are protected against ischemia- and myoglobinuria-induced renal failure*. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2003. **284**(2): p. F267-73.
75. LeVine, H., 3rd, *Structural features of heterotrimeric G-protein-coupled receptors and their modulatory proteins*. *Mol Neurobiol*, 1999. **19**(2): p. 111-49.
76. Lin, J.J., P.C. Churchill, and A.K. Bidani, *Effect of theophylline on the initiation phase of postischemic acute renal failure in rats*. *J Lab Clin Med*, 1986. **108**(2): p. 150-4.
77. Lin, J.J., P.C. Churchill, and A.K. Bidani, *Theophylline in rats during maintenance phase of post-ischemic acute renal failure*. *Kidney Int*, 1988. **33**(1): p. 24-8.
78. Linn, C., Heidemann, H., Osswald, H., *Effect of amphotericin B on renal hemodynamics and renin secretion rate in anesthetized rats*. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 1986. **Suppl 334: R38**.
79. Löscher, W., *Zentrale Analeptika*. *Pharmakotherapie bei Haus- und Nutztieren*, ed. W. Löscher, Ungemach, F. R., Kroker, R. 1997, Berlin, Hamburg: Verlag Parey. 111-113.
80. Luippold, G., M. Beilharz, and B. Muhlbauer, *Reduction of glomerular hyperfiltration by dopamine D(2)-like receptor blockade in experimental diabetes mellitus*. *Nephrol Dial Transplant*, 2001. **16**(7): p. 1350-6.

81. Marraccini, P., et al., *Adenosine-induced renal vasoconstriction in man*. Cardiovasc Res, 1996. **32**(5): p. 949-53.
82. McLaughlin, G.E., M.P. Land, and M. Rossique-Gonzalez, *Effect of aminophylline on urine flow in children with tacrolimus-induced renal insufficiency*. Transplant Proc, 2000. **32**(4): p. 817-20.
83. Miller, W.L., et al., *Adenosine production in the ischemic kidney*. Circ Res, 1978. **43**(3): p. 390-7.
84. Munger, K.A., et al., *The effects of surgery and acute rejection on glomerular hemodynamics in the transplanted rat kidney*. Transplantation, 1993. **55**(6): p. 1219-24.
85. Munger, K.A. and E.K. Jackson, *Effects of selective A1 receptor blockade on glomerular hemodynamics: involvement of renin-angiotensin system*. Am J Physiol, 1994. **267**(5 Pt 2): p. F783-90.
86. Murray, J.E., J.P. Merrill, and J.H. Harrison, *Renal homotransplantation in identical twins*. 1955. J Am Soc Nephrol, 2001. **12**(1): p. 201-4.
87. Murray, J.E., et al., *Prolonged survival of human-kidney homografts by immunosuppressive drug therapy*. N Engl J Med, 1963. **268**: p. 1315-23.
88. Nagashima, K., H. Kusaka, and A. Karasawa, *Protective effects of KW-3902, an adenosine A1-receptor antagonist, against cisplatin-induced acute renal failure in rats*. Jpn J Pharmacol, 1995. **67**(4): p. 349-57.
89. Nehlig, A., *Are we dependent upon coffee and caffeine? A review on human and animal data*. Neurosci Biobehav Rev, 1999. **23**(4): p. 563-76.
90. Okusa, M.D., et al., *A(2A) adenosine receptor-mediated inhibition of renal injury and neutrophil adhesion*. Am J Physiol Renal Physiol, 2000. **279**(5): p. F809-18.
91. Okusa, M.D., et al., *Selective A2A adenosine receptor activation reduces ischemia-reperfusion injury in rat kidney*. Am J Physiol, 1999. **277**(3 Pt 2): p. F404-12.
92. Osswald, H., *Renal effects of adenosine and their inhibition by theophylline in dogs*. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol, 1975. **288**(1): p. 79-86.
93. Osswald, H., *The role of adenosine in the regulation of glomerular filtration rate and renin secretion*. Pharmacol Sci, 1984. **5**: p. 94-97.



94. Osswald, H. and C. Gleiter, [*Renal effects of adenosine: possible consequences for kidney transplantation*]. Zentralbl Chir, 1993. **118**(2): p. 90-102.
95. Osswald, H., Helmlinger, J., Jendralski, A., Abrar, B., *Improvement of renal function by theophylline in the acute failure of the rat*. Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol, 1979(307 (Suppl): R47).
96. Osswald, H., B. Muhlbauer, and F. Schenk, *Adenosine mediates tubuloglomerular feedback response: an element of metabolic control of kidney function*. Kidney Int Suppl, 1991. **32**: p. S128-31.
97. Osswald, H., B. Muhlbauer, and V. Vallon, *Adenosine and tubuloglomerular feedback*. Blood Purif, 1997. **15**(4-6): p. 243-52.
98. Osswald, H., G. Nabakowski, and H. Hermes, *Adenosine as a possible mediator of metabolic control of glomerular filtration rate*. Int J Biochem, 1980. **12**(1-2): p. 263-7.
99. Osswald, H., H.J. Schmitz, and O. Heidenreich, *Adenosine response of the rat kidney after saline loading, sodium restriction and hemorrhagia*. Pflugers Arch, 1975. **357**(3-4): p. 323-33.
100. Osswald, H., H.J. Schmitz, and R. Kemper, *Tissue content of adenosine, inosine and hypoxanthine in the rat kidney after ischemia and postischemic recirculation*. Pflugers Arch, 1977. **371**(1-2): p. 45-9.
101. Osswald, H., H.J. Schmitz, and R. Kemper, *Renal action of adenosine: effect on renin secretion in the rat*. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol, 1978. **303**(1): p. 95-9.
102. Osswald, H., W.S. Spielman, and F.G. Knox, *Mechanism of adenosine-mediated decreases in glomerular filtration rate in dogs*. Circ Res, 1978. **43**(3): p. 465-9.
103. Osswald, H., V. Vallon, and B. Muhlbauer, *Role of adenosine in tubuloglomerular feedback and acute renal failure*. J Auton Pharmacol, 1996. **16**(6): p. 377-80.
104. Osswald, H., Vallon, V., *Tubuloglomerular feedback and its role in acute renal failure*. Critical Care Nephrology, ed. C.R.a.R. Bellomo. 1998: Kluwer Academic Publishers. 613-622.

105. Panjehshahin, M.R., et al., *Further characterization of the protective effect of 8-cyclopentyl-1,3-dipropylxanthine on glycerol-induced acute renal failure in the rat.* J Pharm Pharmacol, 1992. **44**(2): p. 109-13.
106. Pessah, I.N., R.A. Stambuk, and J.E. Casida, *Ca<sup>2+</sup>-activated ryanodine binding: mechanisms of sensitivity and intensity modulation by Mg<sup>2+</sup>, caffeine, and adenine nucleotides.* Mol Pharmacol, 1987. **31**(3): p. 232-8.
107. Pfaffl, M.W., *A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR.* Nucleic Acids Res, 2001. **29**(9): p. e45.
108. Pfeifer, C.A., F. Suzuki, and E.K. Jackson, *Selective A1 adenosine receptor antagonism augments beta-adrenergic-induced renin release in vivo.* Am J Physiol, 1995. **269**(4 Pt 2): p. F469-79.
109. Pflueger, A.C., *Renale Wirkung von Adenosin bei Sprague Dawley Ratten mit experimentellem Diabetes mellitus,* in *Medizinische Fakultät.* 1997, Eberhard-Karls-Universität: Tübingen.
110. Pflueger, A.C., F. Schenk, and H. Osswald, *Increased sensitivity of the renal vasculature to adenosine in streptozotocin-induced diabetes mellitus rats.* Am J Physiol, 1995. **269**(4 Pt 2): p. F529-35.
111. Racusen, L.C., et al., *The Banff 97 working classification of renal allograft pathology.* Kidney Int, 1999. **55**(2): p. 713-23.
112. Ralevic, V. and G. Burnstock, *Receptors for purines and pyrimidines.* Pharmacol Rev, 1998. **50**(3): p. 413-92.
113. Rall, T.W., *Central nervous stimulants. The xanthines.* 6th ed. The Pharmacological Basis of Therapeutics, ed. A.G. Gilman, Goodman, L., Gilman, A. 1980, New York: McMillan. 592-607.
114. Rall, T.W., *Evolution and mechanism of action of methylxanthines: from calcium mobilizers to antagonists of adenosine receptors.* Pharmacologist, 1982. **24**: p. 277-287.
115. Rall, T.W., *Drugs used in treatment of asthma. The methylxanthines, cromolyn sodium, and other agents.* Principles of Pharmacological Therapeutics, ed. G. Gillman. Vol. Chapter 25. 1993: Goodman Gillman. 618-628.
116. Rall, T.W. and E.W. Sutherland, *Formation of a cyclic adenine ribonucleotide by tissue particles.* J Biol Chem, 1958. **232**(2): p. 1065-76.

117. Ramos-Salazar, A. and A.D. Baines, *Role of 5'-nucleotidase in adenosine-mediated renal vasoconstriction during hypoxia*. J Pharmacol Exp Ther, 1986. **236**(2): p. 494-9.
118. Rieg, T., et al., *Requirement of intact adenosine A1 receptors for the diuretic and natriuretic action of the methylxanthines theophylline and caffeine*. J Pharmacol Exp Ther, 2005. **313**(1): p. 403-9.
119. Rousseau, E., et al., *Activation of the Ca<sup>2+</sup> release channel of skeletal muscle sarcoplasmic reticulum by caffeine and related compounds*. Arch Biochem Biophys, 1988. **267**(1): p. 75-86.
120. Sakai, K., J. Aono, and K. Haruta, *Species differences in renal vascular effects of dipyridamole and in the potentiation of adenosine action by dipyridamole*. J Cardiovasc Pharmacol, 1981. **3**(3): p. 420-30.
121. Schneeberger, H., et al., *Nonspecific primary ischemia/reperfusion injury in combination with secondary specific acute rejection-mediated injury of human kidney allografts contributes mainly to development of chronic transplant failure*. Transplant Proc, 1997. **29**(1-2): p. 948-9.
122. Schrader, J., F.J. Haddy, and E. Gerlach, *Release of adenosine, inosine and hypoxanthine from the isolated guinea pig heart during hypoxia, flow-autoregulation and reactive hyperemia*. Pflugers Arch, 1977. **369**(1): p. 1-6.
123. Schwartz, R. and W. Dameshek, *The effects of 6-mercaptopurine on homograft reactions*. J Clin Invest, 1960. **39**: p. 952-8.
124. Southard, J.H., et al., *Important components of the UW solution*. Transplantation, 1990. **49**(2): p. 251-7.
125. Squifflet, J.P., *From leg transplantation by St Cosmas and St Damian to the modern era*. Acta Chir Belg, 2003. **103**(3 Spec No): p. 6-9.
126. Starzl, T.E., T.L. Marchioro, and W.R. Waddell, *The Reversal of Rejection in Human Renal Homografts with Subsequent Development of Homograft Tolerance*. Surg Gynecol Obstet, 1963. **117**: p. 385-95.
127. Stefoni, S., et al., *The history of clinical renal transplant*. J Nephrol, 2004. **17**(3): p. 475-8.
128. Su, J.Y. and W. Hasselbach, *Caffeine-induced calcium release from isolated sarcoplasmic reticulum of rabbit skeletal muscle*. Pflugers Arch, 1984. **400**(1): p. 14-21.

129. Sun, D., et al., *Mediation of tubuloglomerular feedback by adenosine: evidence from mice lacking adenosine 1 receptors*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(17): p. 9983-8.
130. Sun, D., Samuelson, L.C., Yang, T., Huang, Y., Paliege, A., Saunders, T., Briggs, J., Schnermann, J., *Mediation of tubuloglomerular feedback by adenosine: evidence from mice lacking adenosine 1 receptors*. Proc Natl Acad Sci USA, 2001(98): p. 9983-9988.
131. Sutherland, E.W. and T.W. Rall, *Fractionation and characterization of a cyclic adenine ribonucleotide formed by tissue particles*. J Biol Chem, 1958. **232**(2): p. 1077-91.
132. Suzuki, F., et al., *Adenosine A1 antagonists. 2. Structure-activity relationships on diuretic activities and protective effects against acute renal failure*. J Med Chem, 1992. **35**(16): p. 3066-75.
133. Tagawa, H. and A.J. Vander, *Effects of adenosine compounds on renal function and renin secretion in dogs*. Circ Res, 1970. **26**(3): p. 327-38.
134. Thadhani, R., M. Pascual, and J.V. Bonventre, *Acute renal failure*. N Engl J Med, 1996. **334**(22): p. 1448-60.
135. Thomson, S., et al., *Adenosine formed by 5'-nucleotidase mediates tubuloglomerular feedback*. J Clin Invest, 2000. **106**(2): p. 289-98.
136. Tilney, N.L. and R.D. Guttman, *Effects of initial ischemia/reperfusion injury on the transplanted kidney*. Transplantation, 1997. **64**(7): p. 945-7.
137. Ullmann, E., *Experimentelle Nierentransplantation*. Wien Klin Wochenschr, 1902. **15**: p. 281-283.
138. Vallon, V., *Tubuloglomerular feedback and the control of glomerular filtration rate*. News Physiol Sci, 2003. **18**: p. 169-74.
139. Vallon, V., B. Muhlbauer, and H. Osswald, *Adenosine and kidney function*. Physiol Rev, 2006. **86**(3): p. 901-40.
140. Van Waarde, A., et al., *Protection of the kidney against ischemic injury by inhibition of 5'-nucleotidase*. Am J Physiol, 1989. **256**(2 Pt 2): p. F298-305.
141. Weber, A. and R. Herz, *The relationship between caffeine contracture of intact muscle and the effect of caffeine on reticulum*. J Gen Physiol, 1968. **52**(5): p. 750-9.

142. Weihprecht, H., et al., *Synergistic effects of angiotensin and adenosine in the renal microvasculature*. Am J Physiol, 1994. **266**(2 Pt 2): p. F227-39.
143. Weihprecht, H., et al., *Effect of adenosine1-receptor blockade on renin release from rabbit isolated perfused juxtaglomerular apparatus*. J Clin Invest, 1990. **85**(5): p. 1622-8.
144. Wolfe, R.A., et al., *Comparison of mortality in all patients on dialysis, patients on dialysis awaiting transplantation, and recipients of a first cadaveric transplant*. N Engl J Med, 1999. **341**(23): p. 1725-30.
145. Yao, K., et al., *Protective effects of KW-3902, a novel adenosine A1-receptor antagonist, against gentamicin-induced acute renal failure in rats*. Jpn J Pharmacol, 1994. **65**(2): p. 167-70.
146. Yates, M.S., et al., *Effect of 8-phenyltheophylline, enprofylline and hydrochlorothiazide on glycerol-induced acute renal failure in the rat*. J Pharm Pharmacol, 1987. **39**(10): p. 803-8.

### 7. Abkürzungen

°C	Grad Celsius
A., a.	Arteria
A1AR	Adenosin-A1-Rezeptor
A2AAR	Adenosin-A2A-Rezeptor
A2BAR	Adenosin-A2B-Rezeptor
A3AR	Adenosin-A3-Rezeptor
µM	Mikromol
Abb.	Abbildung
AdoR	Adenosinrezeptor
ADP	Adenosindiphosphat
AMP	Adenosinmonophosphat
ANV	akutes Nierenversagen
ATP	Adenosintriphosphat
Ca	Kalzium
cAMP	zyklisches AMP
CD	Cluster of Differentiation
cDNA	zyklische DNA
Cl	Chlorid
CsA	Cyclosporin A
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DPCPX	8-Cyclopentyl-1,3-dipropylxanthin
ELISA	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
FE <sub>K</sub>	fraktionierte Kaliumausscheidung
FE <sub>Na</sub>	fraktionierte Natriumausscheidung
GFR	glomeruläre Filtrationsrate
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
HE	Hämatoxylin-Eosin
Hkt	Hämatokrit

I.E.	Internationale Einheiten
I/R-Schaden	Ischämie- / Reperfusionsschaden
i.v.	intravenös
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
K	Kalium
KAR	Klemmung der Arteria renalis
KG	Körpergewicht
KIZ	kalte Ischämiezeit
KT	Nierentransplantation (kidney transplantation)
MAP	Mittlerer arterieller Blutdruck
MD	Macula densa
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
mRNA	messenger RNA
mTOR	mammalian Target Of Rapamycine
Na	Natrium
NaCl	Natriumchlorid
NAD	Nicotinamidadenindinukleotid
NADH	Nicotinamidadenindinukleotidhydrogen
NG	Nierengewicht
nmol	Nanomol
NTx	Nierentransplantation
p.o.	per os
PAS	Periodic Acid Schiff
PCR	Polymerasekettenreaktion
POR	postocclusive reduction of renal blood flow
RNA	Ribonukleinsäure
s.c.	subkutan
SAH	S-Adenylnhomocystein
SEM	Standard error of the mean
Tab.	Tabelle
TGF	Tubuloglomeruläres Feedback

## ABKÜRZUNGEN

---

TM	Transmembrandomänenrezeptor
TNF	Tumornekrosefaktor
UW-Lsg.	University of Wisconsin Lösung



## 8. Publikationen und Vorträge

### Wissenschaftliche Originalarbeiten in referierten Journalen

Grenz A, **Baier D**, Petroktistis F, Wehrmann M, Köhle C, Schenk M, Sessler M, Gleiter CH, Fandrich F, Osswald H. Theophylline improves early allograft function in rat kidney transplantation. *J Pharmacol Exp Ther* 317(2): 473-479, 2006.

Impact factor: 4.1

### Zitierbare wissenschaftliche Abstracts

1. **Baier D**, Petroktistis F, Wehrmann M, Köhle C, Schenk M, Sessler M, Gleiter CH, Fändrich F, Osswald H, Grenz A. Theophylline improves allograft function in rat kidney transplantation. *Nephro-News* 12: 132A, 2005.
2. Grenz A, Petroktistis F, **Baier D**, Wehrmann M, Schenk M, Sessler M, Gleiter CH, Faendrich F, Osswald H. Theophylline improves allograft function after kidney transplantation in rats. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 369, Supplement 1: 127A, 2004.
3. Grenz A, **Baier D**, Petroktistis F, Gebhard C, Schenk M, Wehrmann M, Sessler M, Faendrich F, Osswald H. Theophylline in the prevention of reperfusion injury in kidney transplantation in rats. *J Am Soc Nephrol* 14: 182A, 2003.

**Wissenschaftliche Vorträge**

1. **Baier D**, Petroktistis F, Wehrmann M, Köhle C, Schenk M, Sessler M, Gleiter CH, Fändrich F, Osswald H, Grenz A. Theophylline improves allograft function in rat kidney transplantation. 36. Kongress der Gesellschaft für Nephrologie, Saarbrücken, September 2005.
2. Grenz A, Petroktistis F, **Baier D**, Wehrmann M, Schenk M, Sessler M, Gleiter CH, Faendrich F, Osswald H. Theophylline improves allograft function after kidney transplantation in rats. 45. Frühjahrstagung der Deutsche Gesellschaft für experimentelle und klinische Pharmakologie und Toxikologie, Mainz, März 2004.
3. Grenz A, **Baier D**, Petroktistis F, Gebhard C, Schenk M, Wehrmann M, Sessler M, Faendrich F, Osswald H. Theophylline in the prevention of reperfusion injury in kidney transplantation in rats. 36<sup>th</sup> Annual Meeting and Scientific Exposition, ASN (The American Society of Nephrology), San Diego, USA, November 2003.

## 9. Danksagung

Mein Dank gilt meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. H. Oßwald für die Überlassung des Themas, viele interessante Diskussionen und Anregungen während der Erstellung der Arbeit.

Mein besonderer Dank gilt Frau Dr. Almut Grenz für die unermüdliche Unterstützung bei Planung, Durchführung und Auswertung der Studie, ohne die die Erstellung dieser Arbeit in dieser Form nicht möglich gewesen wäre.

Ebenso danke ich Herrn Dr. Fotios Petroktistis für seine Hilfe bei der Erlernung der Technik der Nierentransplantation an der Ratte.

Herrn Walter Beer danke ich für seine Unterstützung bei der Durchführung der Messungen.

## 10. Lebenslauf

Name: Hans-Detlef Baier  
Geb.-Datum: 05.05.1977  
Geb.-Ort: Rupea /Rumänien

### Schulbildung:

---

1983-1987	Grundschule Neuhausen-Steinegg
1987-1996	Hebel-Gymnasium Pforzheim
Juni 1996	allgemeine Hochschulreife

### Wehrdienst:

---

1996-1997	Grundwehrdienst beim 2. Stabs- und Fernmeldebataillon 10 in Sigmaringen
-----------	---

### Studium:

---

04/1998	Beginn des Studiums der Humanmedizin an der Eberhard-Karls-Universität Tübingen
04/2000	Ärztliche Vorprüfung
04/2001	Erster Abschnitt der ärztlichen Prüfung
09/2003	Zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung
10/03-09/04	Praktisches Jahr
	1. Tertial: Allgemein- und Unfallchirurgie, Marienhospital Stuttgart
	2. Tertial: Wahlfach Plastische Chirurgie, Marienhospital Stuttgart
	3. Tertial: Innere Medizin, Inselspital Bern, Notfallzentrum

10/2004            Beginn des Studiums der Zahnmedizin an der  
Eberhard-Karls-Universität Tübingen

16.11.2004        Dritter Abschnitt der ärztlichen Prüfung  
Approbation als Arzt

**Beruf:**

---

Seit 10 /2005     Assistenzarzt in der Universitätsklinik für Mund-,  
Kiefer- und Gesichtschirurgie in Tübingen  
(Ärztl. Direktor: Prof. Dr. Dr. S. Reinert)