

Aus dem Institut für Anatomie und Zellbiologie
der Medizinischen Fakultät der
Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
(Leitung Prof. Dr. med. Heike Kielstein)

**Hippocampale Expression von Agmatinase und Sperminsynthase
bei 5/6 nephrektomierten Ratten – einem Modell der
chronischen Nierenschädigung**

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Medizin (Dr. med.)

vorgelegt der

Medizinischen Fakultät der

Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von **Felix Stein**

geb. 02.09.1990 in Burgstädt

- Gutachter:**
1. Prof. Dr. med. Heike Kielstein
 2. Prof. Dr. sc. nat. Hans-Gert Bernstein, Magdeburg
 3. Prof. Dr. med. Tom H. Lindner, Leipzig

01.12.2015

10.10.2016

Referat

Die Behandlung der chronischen Nierenschädigung/-insuffizienz stellt immer mehr eine Belastung des öffentlichen Gesundheitswesens dar. Seit einigen Jahren werden zunehmend depressive Symptome bei Patienten mit einer Nierenfunktionseinschränkung beobachtet. Die Ursachen für das gehäufte Auftreten von Depressionen bei Patienten mit chronischer Nierenschädigung sind nicht ausreichend untersucht. Es ist beschrieben, dass bestimmte Polyamine wie Agmatin und Putrescin antidepressive Effekte aufweisen. In dieser Dissertation soll untersucht werden, ob die Enzyme Agmatinase und Sperminsynthase, die in den Polyaminzyklus eingebunden sind, an der Entstehung der Depression bei niereninsuffizienten Patienten beteiligt sind. Dabei wurden die Agmatinase- und Sperminsynthaseexpressionen in Hippocampi von 53 männlichen Sprague-Dawley Ratten detektiert. Es erfolgte eine Unterteilung in 6 Gruppen. Die Expression der Enzyme wurde in Hippocampi von Ratten, die eine 0,9% -Natriumchlorid (NaCl) -Infusion, eine Asymmetrisches Dimethylarginin (ADMA) -Infusion oder eine 5/6 Nephrektomie erhielten, bestimmt. Die Auswertung erfolgte nach immunhistochemischer Anfärbung der Agmatinase und der Sperminsynthase in den Schnitten der Rattenhirne im Bereich des Hippocampus anhand von Computerprogrammen durch Helligkeitsbestimmung. Es zeigte sich im Vergleich zu den Kontrolltieren, die mit einer NaCl-Lösung infundiert wurden, bei den 5/6 nephrektomierten Ratten eine Erhöhung der Agmatinaseexpression um etwa 5%. Bei den mit ADMA infundierten Ratten zeigte sich eine Verringerung der Expression um 9%. Diese Unterschiede waren jedoch nicht statistisch signifikant. Im Vergleich zur Kontrollgruppe konnte bei den 5/6 nephrektomierten Ratten (Tötung nach 4 Wochen) eine Expressionssteigerung der Sperminsynthase im Hippocampus um 21% eruiert werden. Um 34% erhöht zeigte sich die Enzymexpression bei Tieren, welche eine ADMA-Infusion erhielten. Diese Ergebnisse waren statistisch signifikant. Mit dieser Dissertation konnte somit gezeigt werden, dass die beiden untersuchten Enzyme im Rahmen der Verstoffwechslung der Polyamine im Argininzyklus bei niereninsuffizienten Ratten zum Teil deutlich höher im Hippocampus exprimiert waren, als bei den Kontrolltieren. Sollte sich dies auch bei nierengeschädigten Patienten finden, könnte es dadurch eventuell zu einem depressionsfördernden Effekt kommen.

Stein, Felix: Hippocampale Expression von Agmatinase und Sperminsynthase bei 5/6 nephrektomierten Ratten – einem Modell der chronischen Nierenschädigung, Halle (Saale), Univ., Med. Fak., Diss., 35 Seiten, 2016

I. Inhaltsverzeichnis

II. Abkürzungsverzeichnis	1
III. Abbildungsverzeichnis	3
1. Einleitung	4
1.1. Die chronische Nierenschädigung im Zusammenhang mit Depressionen	4
1.2. Agmatinase	5
1.3. Sperminsynthase	7
1.4. Agmatinase und Sperminsynthase in Bezug auf den Polyaminzyklus und ihrer jeweiligen hippocampalen Expression	8
1.5. Zielsetzung der Arbeit und wissenschaftliche Fragestellung	10
2. Methoden und Materialien.....	11
2.1. Versuchstiere	11
2.2. Experimentelles Design	11
2.3. Tötung und Organentnahme	12
2.4. Immunhistochemie.....	13
2.5. Auswertung der Histologie	14
2.6. Statistische Analyse mithilfe von Computer Software	15
3. Ergebnisse	17
3.1. Agmatinaseexpression im Hippocampus	17
3.2. Sperminsynthaseexpression im Hippocampus.....	20
4. Diskussion	23
5. Zusammenfassung.....	33

6.	Literaturverzeichnis	35
7.	Thesen	39
	Lebenslauf (Curriculum vitae)	40
	Selbstständigkeitserklärung	44
	Erklärung über frühere Promotionsversuche	45
	Danksagung.....	46

II. Abkürzungsverzeichnis

ADMA	Asymmetrisches Dimethylarginin
AGMAT	Agmatinase
bzw.	Beziehungsweise
Ca ²⁺	Kalzium
DAB	Diaminobenzidin
dl	Deziliter
g	Gramm
HCl	Chlorwasserstoff
kcal	Kilokalorien
ml	Milliliter
mol	Mol (Stoffmenge)
n=	Anzahl der Versuchstiere
NaCl	Natrumchlorid
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
NO	Stickstoffmonoxid
Nx	5/6 Nephrektomie
ODC	Ornithindecaboxylase
S.E.M.	standard error of the mean, Standardfehler
SMS	Sperminsynthase
SRM	Spermidinsynthase
°C	Grad Celsius

μl Mikroliter

μm Mikrometer

III. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1	Katalysierter Reaktionsweg der Agmatinase verändert nach Brenda - The comprehensive Enzyme Information System [1]
Abbildung 2	Dreidimensionale Struktur der Agmatinase, verändert nach USCN Life Science Inc. [2]
Abbildung 3	Katalysierter Reaktionsweg der Sperminsynthase modifiziert nach HumanCyc Database Collection [3]
Abbildung 4	Dimerer Aufbau der Sperminsynthase in gebundener Form mit Spermidin und mit freier Bindungsstelle verändert nach Pegg et al. 2010 [4]
Abbildung 5	Der katalysierte Reaktionsweg im Polyaminzyklus modifiziert nach Turecki [5]
Abbildung 6	Image J: Schritt 1: Analyze, Screenshot
Abbildung 7	Image J: Schritt 2: Measure Ergebnis, Screenshot
Abbildung 8	Agmatinaseexpression im Hippocampus in den Versuchstiergruppen, Säulendiagramm
Abbildung 10	Agmatinaseexpression im Hippocampus, bei einem Versuchstier mit ADMA-Infusion, Beispielfoto zur Auswertung der Expression
Abbildung 11	Agmatinaseexpression im Hippocampus bei Versuchstieren mit 5/6 Nephrektomie, Beispielfoto zur Auswertung der Expression
Abbildung 12	Agmatinaseexpression im Hippocampus in den einzelnen Subgruppen, Säulendiagramm
Abbildung 13	Sperminsynthaseexpression im Hippocampus in den verschiedenen Versuchstiergruppen, Säulendiagramm
Abbildung 14	Sperminsynthaseexpression im Hippocampus bei Versuchstieren mit 0,9% NaCl-Infusion, Beispielfoto zur Auswertung der Expression
Abbildung 15	Sperminsynthaseexpression im Hippocampus bei Versuchstieren mit ADMA-Infusion, Beispielfoto zur Auswertung der Expression
Abbildung 16	Sperminsynthaseexpression im Hippocampus bei Versuchstieren mit 5/6 Nephrektomie, Beispielfoto zur Auswertung der Expression
Abbildung 17	Sperminsynthaseexpression im Hippocampus in den einzelnen Subgruppen, Säulendiagramm

1. Einleitung

1.1. Die chronische Nierenschädigung im Zusammenhang mit Depressionen

Die Behandlung der chronischen Nierenschädigung/-insuffizienz wird zunehmend eine Belastung des öffentlichen Gesundheitswesens. Die ungefähre Prävalenz liegt in Deutschland bei 1050 Fällen pro 1.000.000 Einwohner. Dies kann man mit Untersuchungen aus den USA vergleichen, in der 4-8 % der Bevölkerung eine Nierenfunktionseinschränkung aufweisen [6]. Nierenfunktionseinschränkungen sind meist Folge von systemischen Erkrankungen, wobei hier der Diabetes mellitus und der Bluthochdruck im Vordergrund stehen. Dabei sind die Symptome und Komplikationen im Rahmen der chronischen Niereninsuffizienz nicht unerheblich. Durch die Störung der exkretorischen Nierenfunktion mit eventuellem Sistieren der Urinproduktion kann es zu einer ausgeprägten Ödembildung kommen. Auch das Lungenödem, die Herzinsuffizienz und urämische Intoxikationen gehören zu gefürchteten Komplikationen der chronischen Nierenschädigung. Die Patienten weisen daher eine erhöhte Mortalität auf [7]. Sie müssen aufgrund ihrer zahlreichen Komplikationen auch häufiger im Krankenhaus stationär behandelt werden [8]. Seit einigen Jahren aber rücken besonders depressive Symptome bei Patienten mit einer Nierenfunktionseinschränkung in den Vordergrund. In verschiedensten Studien schwankt das Auftreten dieser depressiven Symptome zwischen 15% und 45% [7, 9–11]. Die Studie von Kimmel et al. zeigt, dass die Prävalenz des Auftretens von Depressionen oder depressiven Symptomen bei chronischer Niereninsuffizienz im Vergleich zur Normalbevölkerung 4 mal höher ist [12]. Die Symptome depressiver Verstimmungen oder Depressionen sind vielfältig. Zu den häufigsten psychologischen Symptomen gehören dabei, ohne Anspruch auf Vollständigkeit, vor allem Schläfrigkeit, Angstzustände, reduzierte Konzentrationsfähigkeit, Antriebslosigkeit, sozialer Rückzug sowie Gefühle der Hilflosigkeit und Hoffnungslosigkeit bis hin zu suizidalen Gedanken. Das sind aber nicht die einzigen Erscheinungen, die im Rahmen einer depressiven Stimmungslage auftreten können. Auch körperliche Beschwerden gehören sind häufig. Hier treten besonders häufig Appetitlosigkeit mit Gewichtsverlust, Rücken- oder Kopfschmerzen und Sexualfunktionsstörungen auf. Gastrointestinale Symptome wie chronischer Durchfall oder Übelkeit schränken die betroffenen Patienten stark ein. Beschrieben wurden eine Vielzahl an Risikofaktoren eine Depression zu entwickeln. Darunter zählen ein jüngeres

Alter, weibliches Geschlecht, geringe oder fehlende Berufsausbildung, geringer sozioökonomischer Status und das Auftreten von Begleiterkrankungen wie Diabetes, Bluthochdruck sowie Herzerkrankungen [7].

Die Ursachen für das gehäufte Auftreten von Depressionen bei Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz sind nicht genau erforscht. Mögliche Erklärungsmöglichkeiten liefern Studien, die besagen, dass Depressionen im Zusammenhang mit oxidativen Stress und inflammatorischen Zytokinen [13] stehen. Auch die chronische Nierenschädigung ist mit erhöhten inflammatorischen Zytokinen und oxidativen Stress vergesellschaftet [14, 15]. In einer Studie von Hsu et al. wird ein Zusammenhang zwischen der Entstehung einer Depression und Urämietoxinen, die an der Ätiologie der Niereninsuffizienz beteiligt sind, vermutet [16]. Auch den Polyaminen Putrescin, Spermidin und Spermin werden als Urämietoxinen eine Beteiligung an der Entstehung einer Urämie nachgesagt [17]. Dieses Polyaminsystem ist nach Fiori et al. aber gleichzeitig an der Entstehung von psychischen Erkrankungen, wie Schizophrenie oder depressiver Stimmungslage, beteiligt [18].

Ziel der vorliegenden Dissertation war es, dieses System der Polyamine weiter zu untersuchen. Dabei wurde besonders die Expression der Enzyme Agmatinase und Sperminsynthase im Hippocampus betrachtet. Diese Enzyme sind in den Metabolismus dieses Polyaminsystems eingebunden.

1.2. Agmatinase

Die Agmatinase gehört zur Familie der Hydrolasen und katalysiert im menschlichen Körper eine Reaktion im Polyaminzyklus des Arginin. Aus dem Argininderivat Agmatin, ein Neurotransmitter im Bereich des Putamen, entsteht mithilfe dieses Enzyms ein weiteres Diamin, das Putrescin [19]. Diese Reaktion verbraucht Wasser und es entsteht als Nebenprodukt Harnstoff. In Abbildung 1 wird diese Reaktion dargestellt [20].

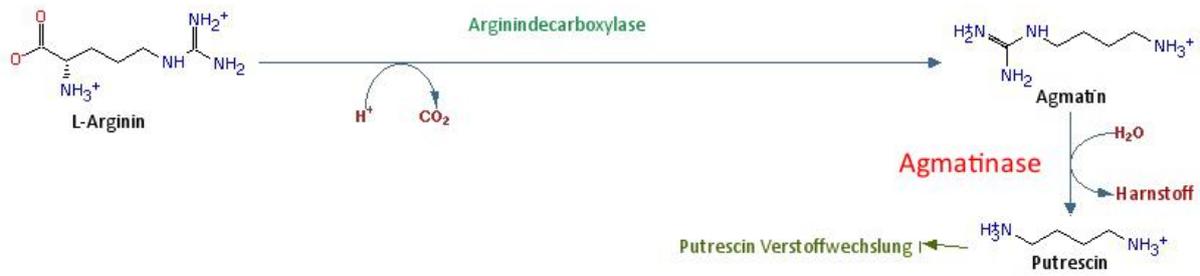


Abbildung 1: Katalysierter Reaktionsweg der Agmatinase verändert nach Brenda - The comprehensive Enzyme Information System [1]

In Abbildung 2 wird der dreidimensionale Aufbau der Agmatinase dargestellt [2]. Da Agmatin als wichtiger Neuromodulator, sogar als Neurotransmitter angesehen wird, spielt die Agmatinase anscheinend eine wichtige Rolle in der Pathogenese bestimmter neurologischer und psychiatrischer Erkrankungen [21]. Agmatin interagiert mit unterschiedlichen Neurotransmittersystemen [22]. In verschiedenen Studien wurde gezeigt, dass dieses Polyamin in den Prozess der Pathogenese von Depressionen und Schizophrenien eingebunden ist [22]. Hier spielt vor allem der N-Methyl-D-Aspartat (NMDA) Rezeptor eine Rolle. Dieser Glutamat-Rezeptor ist in die Entstehung von Depressionen einbezogen [23]. Agmatin gilt als Inhibitor dieses Rezeptors durch Bindung an die $[3\text{H}]-(+)\text{-MK-801}$ Bindungsstelle des NMDA-Rezeptors [24]. Vor allem die Studie von Zomkowski et al. ist für die Annahme entscheidend, dass Agmatin antidepressive Effekte aufweist [25]. Daher liegt die Vermutung nahe, dass die Agmatinase als Inaktivator des antidepressiven Agmatin an der Entstehung der Depression beteiligt ist. Der Genlocus, der für Agmatinase codiert, ist auf Chromosom 1p36 lokalisiert [22]. Dies unterstützt die vorangegangene Vermutung, denn erstaunlicherweise wurde dieser Locus auch mit bipolaren Störungen und Depressionen in Verbindung gebracht [26]. Das Endprodukt der durch die Agmatinase katalysierten Reaktion Putrescin wird als Urämietoxin angesehen. Dieses Polyamin ist bei Patienten mit ausgeprägter Niereninsuffizienz im Serum erhöht [17, 27]. Putrescin gilt als Inhibitor der Erythropoese bei niereninsuffizienten Patienten, welche häufig an der daraus resultierenden renalen Anämie leiden [28]. Diese Erkenntnis lässt ebenfalls den Schluss zu, dass Patienten mit Niereninsuffizienz eine erhöhte Aktivität der Agmatinase aufweisen könnten. Ein weiterer

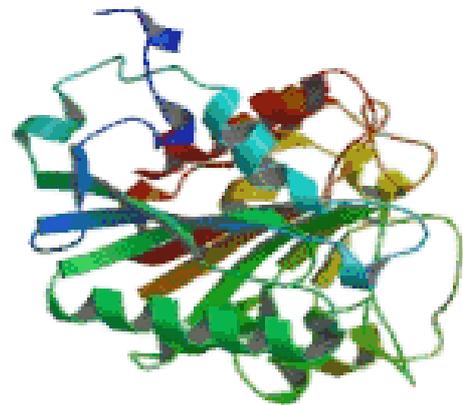


Abbildung 2: Dreidimensionale Struktur der Agmatinase geändert nach USCN Life Science

interessanter Fakt ist, dass die Putrescinkonzentration bei der sogenannten stressinduzierten Polyaminreaktion deutlich erhöht ist. Anteile dieser Polyaminreaktion scheinen ebenfalls an der Depressionsentstehung beteiligt zu sein [29].

1.3. Sperminsynthese

Die Sperminsynthese ist eine Aminopropyltransferase und katalysiert im menschlichen Körper die Reaktion der Polyamine Spermidin in Spermin. Dabei wird S-Adenosyl-L-Methioninamin verbraucht und Wasserstoffionen sowie S-Methyl-5'-Thioadenosin frei [3]. In Abbildung 3 wird der katalysierte Reaktionsweg der Sperminsynthese vereinfacht dargestellt [3]. Das Sperminsynthase Gen befindet sich auf dem kurzen Arm des X-Chromosomes im Bereich der Bande Xp 22.1 [4]. Es ist bekannt, dass die funktionierende Sperminsynthaseaktivität für ein normales Wachstum im menschlichen Körper von

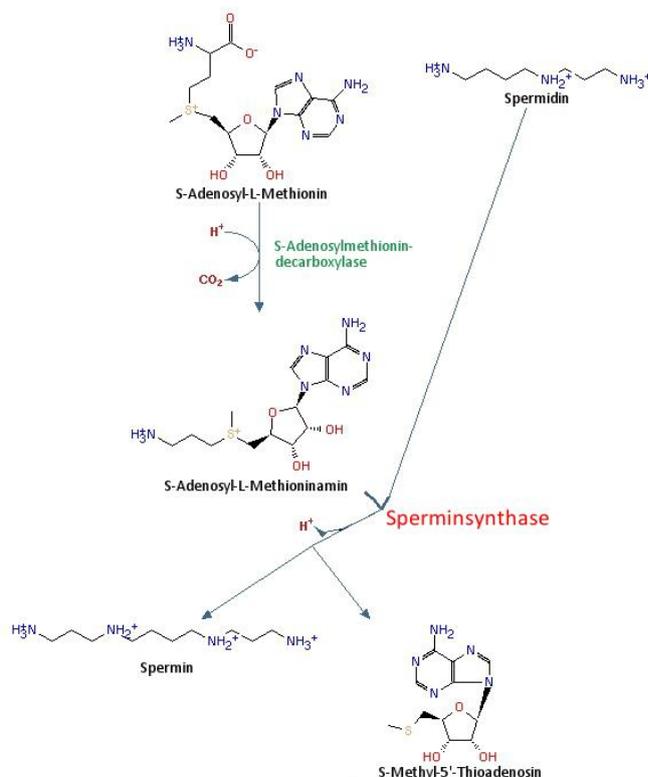


Abbildung 3: Katalysierter Reaktionsweg der Sperminsynthese modifiziert nach HumanCyc Database Collection [3]

entscheidender Bedeutung ist. Das Produkt des katalysierten Reaktionsweges der Sperminsynthese, das Spermin, ist an einer normalen Reproduktion und Fertilität, sowie an normaler Funktion des Innenohrs, des Herzens und des Gehirns beteiligt. Dies zeigen Studien an spezifischen Mausmodellen, bei denen das Sperminsynthasegen auf dem X-Chromosom ausgeschaltet wurde (sogenannte Gy Mäuse) [30]. Mutationen im Sperminsynthasegen auf Xp 22.1 lösen beispielsweise das Snyder-Robinson-Syndrom aus, welches mit mentaler Retardierung, kraniofazialen

Dysmorphien, Hypotonie, marfanoiden Habitus, Skelettanomalien und Osteoporose einhergeht [31]. Damit zeigt sich die Wichtigkeit einer funktionierenden

Sperminsyntheseexpression. In Abbildung 4 ist der dreidimensionale Aufbau der Sperminsynthase dargestellt [4]. Allerdings kann auch eine überschießende Aktivität dieses Enzymes zu Fehlfunktionen führen. Diese sind allerdings eher in der Degradierung von Spermidin zu Spermin zu sehen. Wie bei der Agmatinase gezeigt, spielt der NMDA-Rezeptor bei der Entstehung von Depressionen eine entscheidende Rolle. Eine übermäßige Aktivität dieses Rezeptors mit vermehrter Ca^{2+} Aufnahme ist ein Bestandteil in der Entstehung vieler Neurodegenerativer Erkrankungen [23]. Spermin bindet an eine sehr spezifische Bindungsstelle dieses Rezeptors und verursacht dadurch eine glycinunabhängige oder -abhängige Aktivierung des NMDA-Rezeptors, je nach vorherrschender Glycinkonzentration. Ebenso ist aber auch eine membranspannungsabhängige Inhibition des Rezeptors bekannt

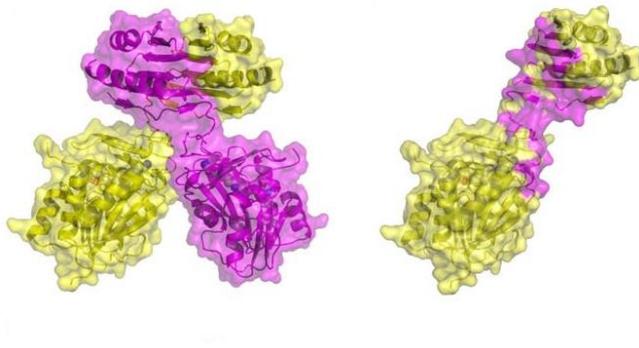


Abbildung 4: Dimerer Aufbau der Sperminsynthase in gebundener Form mit Spermidin und mit freier Bindungsstelle verändert nach Pegg et al. 2010 [4]

[32]. Diese Erkenntnis lässt die Annahme zu, dass das Produkt der Sperminsynthese katalysierten Reaktion Spermin einen depressionsfördernden Effekt aufweist. Im Folgeschluss lässt sich damit auch ein Zusammenhang zur Depressionsförderung durch die Sperminsynthese herstellen. Spermin und Spermidin sind ebenso Urämietoxine und bei niereninsuffizienten Patienten

allerdings typischerweise erniedrigt im Vergleich zu nierengesunden Patienten im Serum nachweisbar[28].

1.4. Agmatinase und Sperminsynthase in Bezug auf den Polyaminzyklus und ihrer jeweiligen hippocampalen Expression

Das antidepressive Agmatin als Substrat der Agmatinase wurde im Hypothalamus, immunhistochemisch vor allem in den Neuronen, in sehr hoher Konzentration detektiert [33]. Bernstein et al. konnten in ihrer Studie darstellen, dass die Agmatinase bei Patienten mit depressiven Störungen deutlich erhöht ist. Dabei war diese Erhöhung besonders im Bereich des Hippocampus und seinen Subregionen detektiert worden [19]. Dies lässt die

Vermutung zu, dass bei Patienten mit progressiver Niereninsuffizienz die Agmatinaseexpression im Hippocampus ebenso erhöht sein könnte. Diese Annahme ist Ursache der vorliegenden Untersuchung der Dissertation. Im weiteren Verlauf des Polyaminzyklus ist auch die Sperminsynthese eingebunden. Aus dem Produkt der Agmatinase katalysierten Reaktion, dem Putrescin, entsteht unter Wirkung des Enzymes Spermidinsynthese Spermidin. Dieses Polyamin wird im weiteren Verlauf durch die Sperminsynthese zu Spermin umgesetzt [34]. Die Abbildung 5 zeigt den zusammenhängenden Reaktionsweg dieser Enzyme [5].

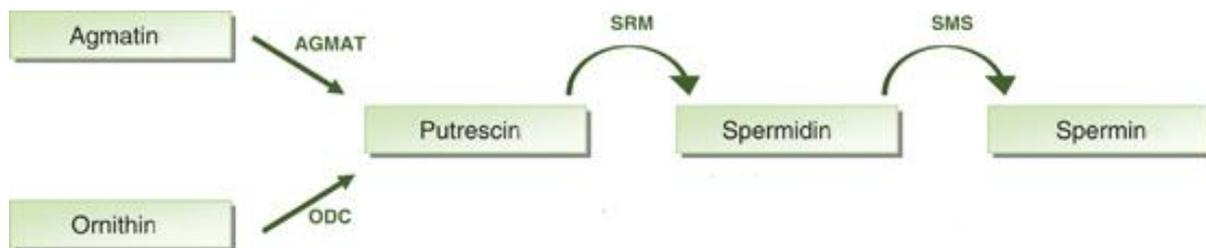


Abbildung 5: Der katalysierte Reaktionsweg im Polyaminzyklus modifiziert nach Turecki [5]

AGMAT= Agmatinase ODC= Ornithindecaboxylase SRM= Spermidinsynthese SMS= Sperminsynthese

In der Studie von Chen et al. wurde gezeigt, dass die Konzentrationen von Putrescin und Spermidin im Gehirn von Personen, welche Selbstmord begangen hatten im Vergleich zur Kontrollgruppe deutlich erhöht waren [35]. Die Datenlage zu den Konzentrationen der katalysierenden Enzyme ist sehr gering. Die Untersuchung, ob eine Erhöhung oder Erniedrigung der Sperminsyntheseexpression bei Patienten mit Niereninsuffizienz in die Entstehung der Depression eingebunden ist, war eine Fragestellung dieser Dissertation. Die verschiedenen Polyamine wie Putrescin, Spermidin und Spermin gelten als Urämietoxine. Dabei ist die Konzentration von Putrescin im Serum von Patienten mit Nierenfunktionsstörungen erhöht, die Konzentration von Spermidin und Spermin tendenziell erniedrigt [36]. Ob es einen Zusammenhang zwischen diesen Ergebnissen bei Patienten mit Niereninsuffizienz und der erhöhten Depressionsanfälligkeit gibt, müssen weitere Untersuchungen zeigen. Die Untersuchung der in den Metabolismus dieser als Urämietoxine geltenden Polyamine einbezogenen Enzyme ist deshalb Gegenstand dieser Untersuchung.

1.5. Zielsetzung der Arbeit und wissenschaftliche Fragestellung

Die chronische Nierenschädigung ist wie beschrieben eine Erkrankung, die aufgrund ihrer mannigfaltigen Ursachen und damit Behandlungsansätzen eine hohe Belastung für das Gesundheitssystem darstellt. Folgen dieser Erkrankung sind schwerwiegend. Herzinsuffizienz und urämische Intoxikationen sind häufig. In letzter Zeit wird in vielen Studien aber auch die Depression als häufige Komplikation bei chronischer Niereninsuffizienz beschrieben. Dies ist für betroffene Patienten sehr belastend und hat damit einen großen Stellenwert für das Outcome des Patienten. An der Depressionsentstehung sind offensichtlich bestimmte Ionenkanäle, wie auch der NMDA-Rezeptor beteiligt. Dieser Rezeptor kann durch bestimmte Substanzen beeinflusst werden. Eine dieser Substanzgruppen ist die der Polyamine. In den Metabolismus der Polyamine sind die Enzyme Agmatinase und Sperminsynthase eingeschlossen. Polyamine wie Spermin, Spermidin und Putrescin, die als Anfangs- oder Endprodukte der durch die zwei vorher erwähnten Enzyme fungieren, werden als Urämietoxine angesehen. Damit ist die Annahme gerechtfertigt, dass diese Enzyme an der Depressionsentstehung bei niereninsuffizienten Patienten beteiligt sein könnten. Die vorliegende Arbeit untersucht damit die Agmatinase- und Sperminsynthaseexpression in Hippocampi niereninsuffizienter Ratten im Vergleich zu nierengesunden Kontrolltieren. Im Einzelnen werden im Rahmen dieser Dissertation folgende Fragestellungen untersucht:

- Wie stark ist die Expression der Agmatinase in Hippocampi nierengesunder Versuchstiere im Vergleich zu niereninsuffizienten Versuchstieren?
- Wie stark ist die Expression der Sperminsynthase in Hippocampi nierengesunder Versuchstiere im Vergleich zu niereninsuffizienten Versuchstieren?
- Gibt es einen Zusammenhang zwischen den Expressionsmustern der Agmatinase und der Sperminsynthase bei niereninsuffizienten Versuchstieren?
- Kann man Ergebnisse der Analysen der Sperminsynthaseexpression in Hippocampi niereninsuffizienter Ratten auf die Depressionsanfälligkeit von Patienten mit chronischer Nierenschädigung extrapolieren?

2. Methoden und Materialien

2.1. Versuchstiere

Die Tiere wurden im Rahmen eines umfangreichen drittmittel-geförderten Projektes in der Medizinischen Hochschule Hannover gehalten, operiert und getötet. Die Gehirne wurden anschließend nach Halle (Saale) transferiert und hier von mir untersucht.

Für die Versuchsreihe wurden insgesamt 53 männliche Sprague-Dawley Ratten im Alter von 10 Wochen verwendet. Die Versuchstiere hatten ein Gewicht von 370g (Gramm) bis 430g. Wir erhielten die Tiere von der Charles River GmbH, Sulzfeld, Deutschland. Gehalten wurden die Tiere in den ersten 3 Tagen in Standardkäfigen in Gruppen von 5 Tieren. Der Käfigboden war mit Standardstreu ausgelegt. Danach wurde jedes einzelne Versuchstier in einen eigenen Plastikkäfig verbracht, der mit Zellulose ausgebettet war. Dabei bestanden zu jeder Zeit die gleichen Umgebungsbedingungen. Es handelte sich um ein klimatisiertes Labor mit einer konstanten Temperatur von 24° C. Der Tag-/Nacht-Rhythmus der Tiere wurde mit einer Hell-Dunkel-Photoperiode von 14 Stunden Helligkeit und 10 Stunden Dunkelheit eingehalten (Tageszyklus 07:00 Uhr bis 21:00 Uhr). Nahrung und Trinkwasser standen den Versuchstieren ad libitum zur Verfügung. Alle Tiere bekamen Standardfutter (Altromin 1234, 50% Kohlenhydrate, 19% Proteine, 12% Wasser, 4% Fett und 2,1 kcal/g) der Altromin GmbH, Lage, Deutschland. Für die Versuchsreihen und Versuchstiere wurden alle ethischen und rechtlichen Voraussetzungen, sowie alle Regelungen erfüllt und eingehalten. Alle in dieser Dissertation durchgeführten Versuche wurden von der Niedersächsischen Regierung (Hannover, Deutschland) genehmigt und hielten sich an die Richtlinien des Rates der Europäischen Gemeinschaft vom 24. November 1986.

2.2. Experimentelles Design

Die 53 Versuchstiere wurden randomisiert in 6 Gruppen eingeteilt. Dabei bestanden die Gruppen 1 bis 4 aus 10 Versuchstieren, die Gruppe 5 enthielt 8 Versuchstiere und 5 Tiere entfielen auf Gruppe 6. Am ersten Tag wurden allen Versuchstieren der Gruppen 1 bis 4

unter Isofluran Inhalationsnarkose subkutane ALZET[®] Pumpen implantiert (Modell 2ML4 mit einer Flussrate von 2,5 $\mu\text{L/h}$). Dadurch konnte allen Tieren der Gruppen eins und zwei 0,9% NaCl-Lösung infundiert werden, die Gruppen 3 und 4 erhielten 250 $\mu\text{mol/kg/Tag}$ Asymmetrisches Dimethylarginin (ADMA) (Alexis Biochemicals, Lausen, Schweiz). Dabei wurde ADMA in 0,9% NaCl-Lösung gelöst, anschließend steril filtriert und anschließend infundiert. Die Versuchstiere in den Gruppen 1 und 3 mit je 10 Tieren wurden nach zwei Wochen Infusion getötet. Die Tötung der Tiere unter 0,9% NaCl- beziehungsweise ADMA-Infusion erfolgte in den Gruppen 2 und 4 nach 4 Wochen. Bei den Versuchstieren in Gruppe 5 und 6 wurde am ersten Tag eine 5/6 Nephrektomie in folgender Weise durchgeführt: Unter Ketamin und Xylazin Anästhesie wurde eine selektive Unterbindung der extrarenalen Aufspaltung der Arteria renalis sinistra durchgeführt. Dies führte in 2/3 der linken Niere zu einem Niereninfarkt. Dadurch war nur noch 1/3 der linken Niere funktionsfähig, was einer Teilresektion der linken Niere gleichkam. Die rechte Niere wurde in toto entfernt [37]. Die nephrektomierten Tiere in Gruppe 5 wurden schließlich nach 3 Wochen getötet, die Tiere in Gruppe 6 nach insgesamt 4 Wochen.

Ursächlich für die Wahl von Asymmetrischen Dimethylarginin als weitere Infusionslösung ist die Erkenntnis, dass ADMA als ein zentrales Urämietoxin angesehen wird. Seine Serumkonzentration ist bei Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz deutlich erhöht. ADMA hat allen Anschein nach einen Einfluss bei der Entstehung von Bluthochdruck und anderer Komplikationen im Verlauf der chronischen Niereninsuffizienz [38].

2.3. Tötung und Organentnahme

Unter Isofluran-Anästhesie (Isofluran-Baxter, 250ml, Baxter Deutschland GmbH, Unterschleißheim) wurde das Abdomen und der Thorax der Tiere geöffnet. Der linke Herzventrikel wurde zur Blutentnahme punktiert. Das Blut wurde mittels 7,5ml Heparin Monovetten[®] (19 I.E./ml Blut, Sarstedt, Nümbrecht) entnommen. Zur in situ Perfusion der Organe wurde eine Kanüle in den linken Ventrikel platziert und mit einer Klemme fixiert. Nach Öffnung des rechten Herzohres wurde für 5 Minuten über die Kanüle im linken Ventrikel heparinisierte, isotone Kochsalzlösung (B|Braun, Melsungen, Germany)

tropfenweise infundiert. Direkt anschließend wurde über den gleichen Zugang für ca. 15 Minuten eine Paraformaldehyd- (4%, Merck, Hohenbrunn) Perfusion durchgeführt. Das Gehirn wurde entnommen und unverzüglich bei -80°C gelagert.

2.4. Immunhistochemie

Es wurden nun von den Gehirnen Gefrierschnitte angefertigt. Dabei wurden 20 Gehirne von Versuchstieren verwendet, welche mit 0,9% NaCl-Lösung infundiert wurden. In dieser Gruppe entfielen 10 Gehirne auf Versuchstiere, welche nach 2 Wochen getötet wurden, wie auch 10 Gehirne auf Ratten, welche nach 4 Wochen getötet wurden. Es wurde die gleiche Aufteilung und Anzahl von Versuchstieren gewählt, welche mit ADMA infundiert wurden. In der Gruppe der 5/6 nephrektomierten Ratten wurden von 13 Versuchstieren Gehirngefrierschnitte angefertigt, wobei 8 Versuchstiere nach 3 Wochen getötet wurden und 5 Tiere nach 4 Wochen getötet wurden. Die Gehirne wurden nach Entnahme bei 4°C für 24 Stunden in 4% Paraformaldehyd und 1 mol Phosphatpuffer fixiert. Um eine Zerstörung der Gewebestruktur beim Einfrieren durch Wasseransammlungen zu verhindern, wurde den Gehirnen durch eine 72 stündige Lagerung in 30% Saccharose (bei 4°C) osmotisch Wasser entzogen. Anschließend erfolgte das Einfrieren der Gehirne bei -20°C . Es wurden mit dem Kryostat (bei $-20 / -25^{\circ}\text{C}$) in koronarer Ebene $40\ \mu\text{m}$ dicke Schnitte angefertigt und in einer mit Phosphatpuffer gefüllten Multiwell-Schale aufgefangen.

Die Färbung startete mit einer zweimaligen Spülung der Schnitte mit Phosphatpuffer, gefolgt von einer 30 minütigen Inkubation in 1% Wasserstoffperoxid. Nach diesem Schritt wurden die Schnitte zweimal für jeweils 5 Minuten mit Phosphatpuffer gespült. Vor der Antikörperinkubation fand eine Reduktion unspezifischer Antikörperbindungen durch Zuführen von Serum der Spezies, aus der der Sekundärantikörper gewonnen wurde und einer Lösung lipophiler Membranen mit Triton X statt. Hierzu wurden die Schnitte für 30 Minuten in Phosphatpuffer mit 5% Kaninchenserum und 0,3% Triton X inkubiert. Ohne weitere Spülschritte folgte nun die (getrennte) Inkubation mit 2 verschiedenen Primärantikörpern: Agmatinase (Agmatinase C-16, Santa Cruz Biotechnologies, Santa Cruz, Kalifornien, USA) und Sperminsynthase (Spermine Synthase, antibodies-online, Aachen, Deutschland). Die Primärantikörper wurden 1:100 in Phosphatpuffer (plus 5%

Kaninchenserum und 0,3% Triton X) verdünnt, und mit den Schnitten für 12 Stunden inkubiert. Im Anschluss daran wurden die Schnitte zweimal für 5 Minuten mit Phosphatpuffer gespült. Die Gehirnschnitte wurden dann bei Raumtemperatur für eine Stunde mit dem jeweiligen sekundären Antikörper (gelöst in Phosphatpuffer plus 5% Kaninchenserum und 0,3% Triton X) gegen das Fc-Fragment des primären Antikörpers (zur Agmatinase Detektion: Kaninchen-anti-Ziege biotinyliert, 1:200; zur Sperminsynthase Detektion: Kaninchen-anti-Maus biotinyliert, 1:200) behandelt. Nach zwei 5 minütigen Waschschritten mit Tris-Chlorwasserstoff (HCl) erfolgte die Inkubation mit dem Farbstoff DAB (Diaminobenzidin). Nach der Inkubationszeit folgte eine 2 malige Spülung der Schnitte mit Tris-HCl für jeweils 5 Minuten. Nun erfolgte die 1 stündige Inkubation mit dem ABC Vector Komplex (VectaStain Elite Kit, PK-6100, Vector Laboratories, Burlingame, Kalifornien, USA). Daran anschließend wurden die Schnitte abermals zweimal für 5 Minuten mit Tris-HCl gewaschen. Abschließend folgte die letzte Inkubation mit dem Farbstoff 3,3'-Diaminobenzidin (Peroxidase Substrate Kit, SK-4100, Sigma Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland) für 15 Minuten. Nach dem Spülen der gefärbten Schnitte mit Phosphatpuffer wurden sie auf Objektträger aufgezogen und bei Raumtemperatur getrocknet. Zur Fixierung auf den Objektträgern wurden die Schnitte auf den Objektträgern jeweils zweimal für 5 Minuten mit Isopropanol und Xylol gespült und abschließend mit Eukitt (Sigma Aldrich Chemie GmbH) eingedeckt.

2.5. Auswertung der Histologie

Die histologische Auswertung fand verblindet am Biozero BZ-8000 Fluoreszenz-Mikroskop® statt. Es wurden Objektive mit 4 bis 10 facher Vergrößerung verwendet. Auf einem Objektträger befand sich ein aufgeklappter Gehirnschnitt im Hippocampusbereich der einzelnen Versuchstiere. Aus jedem Gehirnpräparat der einzelnen Versuchstiere wurden mehrere Objektträger von Gehirnschnitten mit unterschiedlichen Regionen des Hippocampus angefertigt. Die Gewebeschnitte wurden zuerst in der Übersicht qualitativ begutachtet. Dabei wurde darauf geachtet, dass die einzelnen Schnitte keine größeren Fixationsartefakte enthielten. Wenn dies der Fall war, wurden diese Schnitte nicht in die Auswertung einbezogen. Weiterhin wurde nun auf jedem Objektträger ein annähernd

gleicher Bildausschnitt ausgewählt, der den ganzen Umfang des Hippocampus auf dem Objektträger umfasste. Dabei wurde auch darauf geachtet, dass jedes Bild etwa die gleiche Helligkeit und Belichtung besaß. Dies stellte sich bei einigen Schnitten als schwierig heraus. Wurden alle Kriterien annähernd erfüllt, wurde der Bildabschnitt fotodokumentiert und weiter ausgewertet. Dabei wurden in der Gruppe der Versuchstiere, welche mit 0,9% NaCl-Lösung infundiert wurden von jedem Gehirn 2 bis 7 Schnitte angefertigt und ausgewertet. Drei bis sieben Gefrierschnitte wurden pro Gehirn bei Versuchstieren, welche mit ADMA infundiert wurden, erstellt und betrachtet. Auf die Gruppe der 5/6 nephrektomierten Versuchstiere entfielen pro Gehirn zwischen 2 und 8 Schnitte. Es wurden im Gesamten 114 Gehirngefrierschnitte von Versuchstieren untersucht, bei denen das Enzym Agmatinase im Hippocampus immunhistochemisch angefärbt wurde. Ebenso viele Gefrierschnitte wurden von Tieren analysiert, bei denen Sperminsynthese im Hippocampus angefärbt wurde. Somit sind insgesamt 228 Gehirngefrierschnitte mithilfe des Fluoreszenzmikroskopes untersucht worden.

2.6. Statistische Analyse mithilfe von Computer Software

Zur Auswertung jedes einzelnen Bildes der Gewebeschnitte wurde das Programm Image J des National Institutes of Health verwendet. Dabei wurde unter dem Button ANALYZE die Option MEASURE gewählt. Mit dieser Option wurde das Bild hinsichtlich seiner Helligkeit untersucht und ausgewertet. Dies erfolgte durch das Programm nach folgender Formel: $\text{value} = 0.299 \times \text{red} + 0.587 \times \text{green} + 0.114 \times \text{blue}$ [39]. In den Abbildungen 6 und 7 ist der Schritt zur Ermittlung der mittleren Helligkeit dargestellt. Die Ausgabe der gesammelten Daten erfolgte in einer automatisch generierten Tabelle. Zur weiteren statistischen Auswertung wurde dabei nur die mittlere Helligkeit verwendet. Hintergrund der Wahl der Auswertung über die Helligkeit ist die unterschiedlich stark immunhistochemisch angefärbte Enzymexpression im Hippocampusbereich. Um einen potentiellen statistisch signifikanten Effekt der ADMA-Infusion/Nephrektomie zu detektieren wurde ein „one-way ANOVA“ Test mit „treatment“ als Faktor durchgeführt. Zeigte der ANOVA Test signifikante Interaktionen, wurde eine „Fischer's PLSD“ Post-hoc Analyse durchgeführt. Ein p -Wert <0.05 wurde als

signifikant angesehen. Die Daten in dieser Dissertation sind als Mittelwerte + S.E.M. (standard error of the mean, Standardfehler) dargestellt.

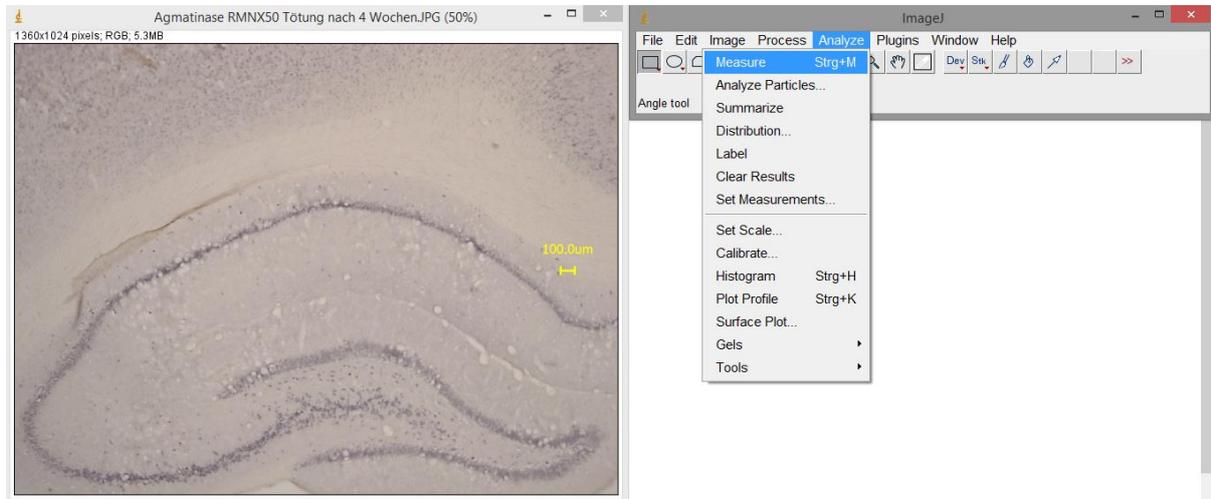


Abbildung 6: Image J: 1. Schritt Analyze

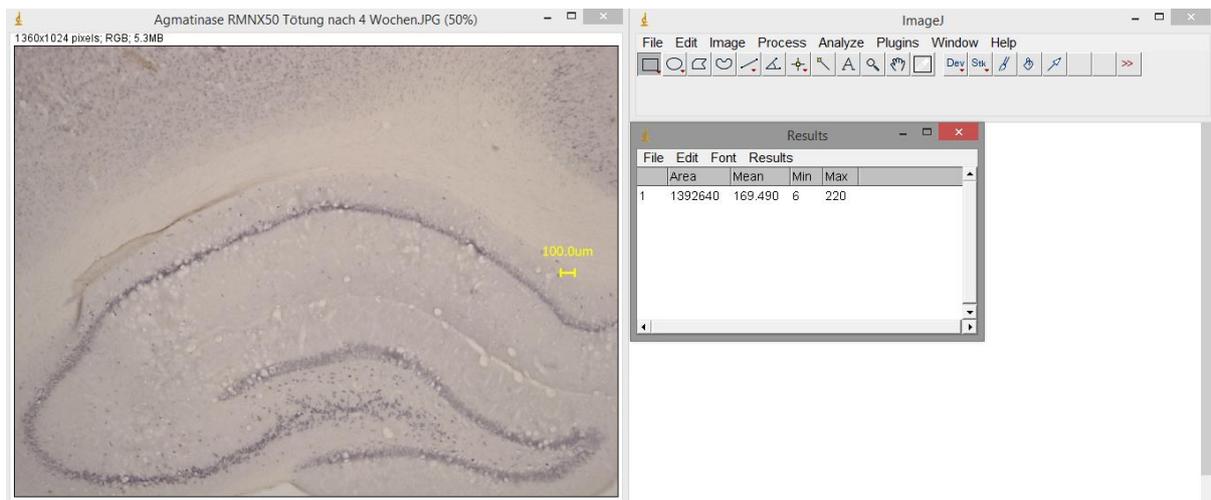


Abbildung 7: Image J: 2. Schritt Measure Ergebnis

3. Ergebnisse

3.1. Agmatinaseexpression im Hippocampus

Die Abbildung 8 zeigt die Agmatinaseexpression im Hippocampus der verschiedenst vorbehandelten Versuchstiere. Auf der Abszisse sind die Gruppen der Versuchstiere aufgezeichnet, welche zum einen über die subkutan liegende Pumpe eine 0,9% NaCl-Lösung und eine ADMA-Lösung erhielten, sowie auch diejenigen Versuchstiere, welche 5/6 nephrektomiert wurden. Die Ordinate zeigt die mittlere Dichte der Agmatinaseexpression. Zu erkennen ist, dass sich die Agmatinaseexpression in den einzelnen Gruppen nicht wesentlich voneinander unterscheidet. Im Vergleich zur Kontrolle, also den Versuchstieren mit 0,9% NaCl-Infusion, ist die Expression bei ADMA-Infusion um etwa 9%

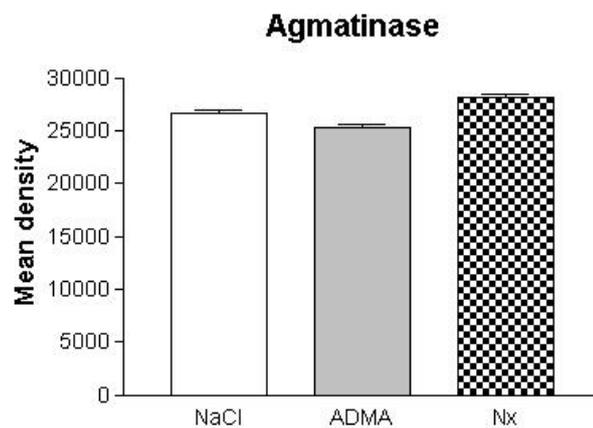


Abbildung 8: Agmatinaseexpression im Hippocampus in den Versuchstiergruppen

NaCl=0,9% Natriumchloridlösung; n=20

ADMA=Asymmetrisches Dimethylarginin; n=20

Nx=5/6 Nephrektomie; n=13

geringer. Auch der Unterschied zwischen Kontrolle und 5/6 nephrektomierten Versuchstieren fällt gering aus. Hier ist eine Erhöhung der Expression um etwa 5% zu erkennen. Im Vergleich der beiden Gruppen mit ADMA-Infusion und 5/6 Nephrektomie ist



Abbildung 9: Agmatinaseexpression im Hippocampus bei einem Versuchstier mit 0,9% NaCl-Infusion

ein Unterschied von ca. 14% zu verzeichnen. Allerdings zeigt das Ergebnis hier bei allen Gruppen keinen signifikanten Unterschied zur Kontrolle mit 0,9% NaCl-Infusion. Die Abbildung 9 zeigt hier die Fotografie des Hippocampus eines Versuchstieres, welches mit 0,9% NaCl-Lösung infundiert wurde. Diese Versuchstiere dienten als Kontrolle der Agmatinaseexpression und stellen ein Modell

von nierengesunden Menschen dar. Zu erkennen ist, dass die violette Färbung, welche durch die immunhistochemische Anfärbung der Agmatinase zustande kommt, weniger gering ausfällt, als in Abbildung 11 zu sehen. In Abbildung 11 ist die Agmatinaseexpression bei Versuchstieren mit 5/6 Nephrektomie fotodokumentiert. Hier zeigt ebenfalls der violette Streifen die immunhistochemisch angefärbte Agmatinase. In gleicher Weise lässt sich Abbildung 10 mit der Agmatinaseexpression bei Versuchstieren mit ADMA-Infusion beschreiben. Zu erahnen ist aus den Fotografien, dass es im Bereich des Cornu ammonis des Hippocampus zu einer leicht vermehrten Agmatinaseexpression kommt. Die Abbildung 10 zeigt den Unterschied von 5% geringerer Expression zur Kontrollgruppe, also zu Abbildung 9 nicht besonders deutlich. Deutlicher hingegen zeigt sich der Unterschied zwischen Abbildung 9 und 11. In Abbildung 11 ist die Betonung der Expression im Ammonshorn nicht zu erkennen. Als weiteres wurde die Aufspaltung der Gruppe der 5/6 nephrektomierten Versuchstiere durchgeführt.

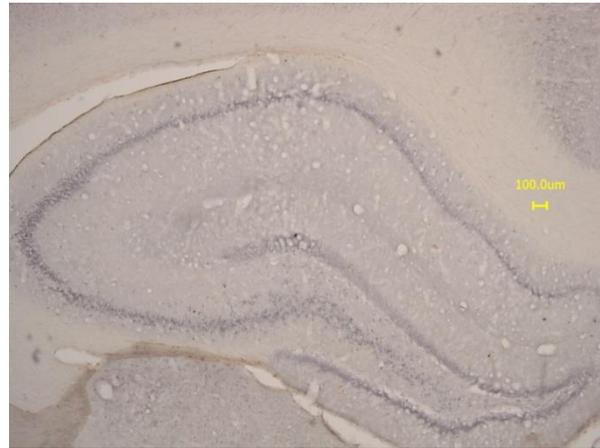


Abbildung 10: Agmatinaseexpression im Hippocampus, bei einem Versuchstier mit ADMA-Infusion



Abbildung 11: Agmatinaseexpression im Hippocampus bei Versuchstieren mit 5/6 Nephrektomie

Anhand Abbildung 12 wird deutlich, dass es keinen Unterschied zwischen der Expression der Agmatinase im Hippocampus bei Versuchstieren mit ADMA-Infusion und 5/6 nephrektomierten Versuchstieren, welche nach 3 Wochen getötet wurden, gibt. Der Unterschied innerhalb der Gruppe der 5/6 nephrektomierten Versuchstiere ist allerdings deutlicher.

Hier zeigt sich eine um etwa 24% höhere Expression der Agmatinase. Im Vergleich zur Kontrolle und zur ADMA Infusion liegt eine Erhöhung um etwa 12% beziehungsweise um etwa 24% vor. Der Unterschied der

Expressionswerte der Agmatinase bei den 5/6 nephrektomierten Versuchstieren, welcher im Vergleich der Abbildungen 8 und 12 auftritt, kommt dadurch zustande, dass in Abbildung 12 die Gruppe der 5/6 Nephrektomierten Versuchstiere noch einmal in Subgruppen aufgespalten wurde. Die Agmatinaseexpression, welche in Abbildung 8 aufgezeigt ist, setzt sich aus den Expressionen der Agmatinase der Versuchstiergruppen zusammen, welche nach 3 und nach 4

Wochen getötet wurden. Somit stellt die Expressionserhöhung der Agmatinase um 5% im Hippocampus 5/6 nephrektomierter Ratten im Vergleich zur Kontrollgruppe den Mittelwert aus den beiden Expressionen der Subgruppen der nephrektomierten Tiere dar. Durch die Auswertung konnte aber keine signifikante Erhöhung der Agmatinaseexpression im Vergleich zwischen Versuchstieren, welche mit 0,9% NaCl-Lösung sowie ADMA-Lösung infundiert wurden und den Versuchstieren, die 5/6 nephrektomiert wurden, festgestellt werden.

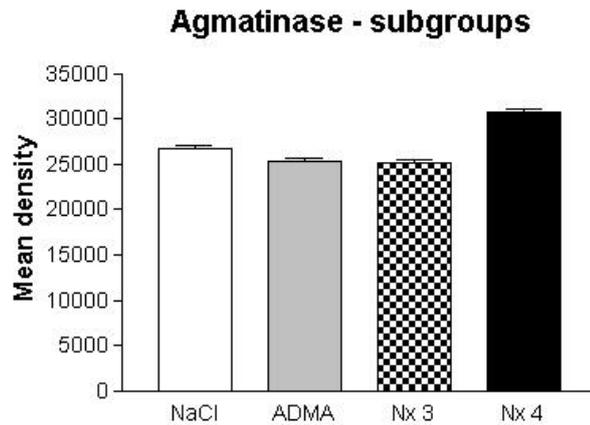


Abbildung 12: Agmatinaseexpression im Hippocampus in den einzelnen Subgruppen

NaCl=0,9% Natriumchloridlösung; n=20

ADMA=Asymmetrisches Dimethylarginin; n=20

Nx 3=5/6 Nephrektomie, Tötung nach 3 Wochen; n=8

Nx 4=5/6 Nephrektomie, Tötung nach 4 Wochen; n=5

3.2. Sperminsyntheseexpression im Hippocampus

In Abbildung 13 ist die Sperminsyntheseexpression im Hippocampus der verschiedenst vorbehandelten Versuchstiere dargestellt. Die Abszisse zeigt die Versuchstiere, die mit 0,9% NaCl-Lösung und mit ADMA-Lösung vorbehandelt wurden, sowie auch die Gruppe der Versuchstiere, die 5/6 nephrektomiert

wurden. Auf der Ordinate ist die mittlere Dichte der Sperminsyntheseexpression aufgetragen. Als erstes wichtiges Ergebnis ist zu nennen, dass es im Gegensatz zur Agmatinaseexpression im Hippocampus bei der Sperminsyntheseexpression in den Gruppen zu einem signifikanten Unterschied kommt. Im Vergleich zur Kontrolle, also den Versuchstieren, die mit 0,9% NaCl-Lösung behandelt wurden, ist die

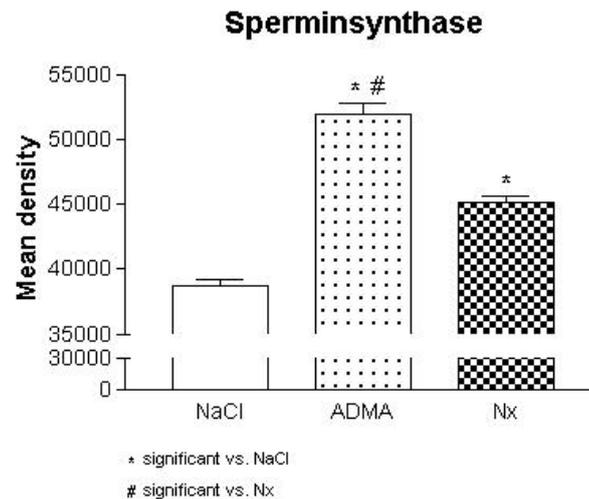


Abbildung 13: Sperminsyntheseexpression im Hippocampus in den verschiedenen Versuchstiergruppen

NaCl=0,9% Natriumchloridlösung; n=20

ADMA=Asymmetrisches Dimethylarginin; n=20

Nx=5/6 Nephrektomie; n=13

Sperminsyntheseexpression bei ADMA-Infusion um etwa 34% höher. Dies lässt sich als signifikanter Unterschied gegenüber der Sperminsyntheseexpression bei Infusion mit 0,9% NaCl-Lösung darstellen. Auch wenn man die Versuchstiere betrachtet, die 5/6 nephrektomiert wurden, ist eine Signifikanz gegenüber der Kontrolle nachweisbar. Hier zeigt sich eine Erhöhung um 17%. Vergleicht man die Gruppe der Versuchstiere mit ADMA-Infusion mit der Gruppe der Versuchstiere, die 5/6 nephrektomiert wurden, zeigt sich auch hier ein signifikanter Unterschied. Die Sperminsyntheseexpression ist bei ADMA-Infusion um nochmals 14% erhöht. In conclusio steht also hier fest, dass die Expression der Sperminsynthese bei ADMA-Infusion gegenüber der Kontrolle und der Gruppe der Nephrektomierten deutlich signifikant erhöht ist. Dies lässt sich auch aus den Fotodokumentationen schließen. In Abbildung 14 ist der Hippocampus eines Versuchstieres

der Gruppe der mit 0,9% NaCl-Lösung infundierten Tiere zu sehen. Auch hier waren diese Versuchstiere als Kontrolle gewählt und stellen wie bei der Agmatinaseexpression das Modell eines nierengesunden Menschen dar. Die hier dunkelblau bis schwarz anmutenden Streifen stellen die Sperminsyntheseexpression durch immunhistochemische Färbung dar. Zu erkennen ist, dass die Intensität der Färbung deutlich geringer ist, als in Abbildung 15 und 16. Dabei ist Abbildung 15 eine Fotografie des Hippocampus eines Versuchstieres, welches mit ADMA-Infusion vorbehandelt wurde. In gleicher Weise zeigt die Abbildung 16 den Hippocampus eines 5/6 nephrektomierten Tieres. Die dunklen Streifen stellen wieder die



Abbildung 14: Sperminsyntheseexpression im Hippocampus bei Versuchstieren mit 0,9% NaCl-Infusion

immunhistochemisch angefärbte Sperminsynthese dar. Auch hier ist aus den Abbildungen zu schließen, dass es zur vermehrten Expression der Sperminsynthese im Bereich des Cornu ammonis kommt. Als weiteres wurde die Aufspaltung der 5/6 nephrektomierten Versuchstiere durchgeführt. Dabei wurde unterschieden zwischen der Gruppe der 5/6 nephrektomierten Tiere, die nach 3 Wochen getötet wurden und der Gruppe

der Tiere, die nach 4 Wochen getötet wurden. In der Abbildung 17 werden diese beiden Gruppen mit den Gruppen verglichen, welche eine 0,9% NaCl-Lösung sowie eine ADMA-Lösung infundiert bekamen und nach 4 Wochen getötet wurden. Auch hier zeigen sich signifikante Unterschiede. Der signifikante Unterschied zwischen der Kontrolle und der ADMA-Infusion ist der gleiche, wie in Abbildung 13 dargestellt. Im Vergleich

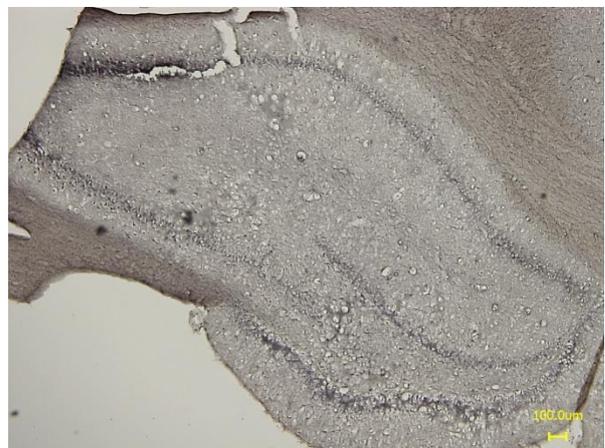


Abbildung 15: Sperminsyntheseexpression im Hippocampus bei Versuchstieren mit ADMA-Infusion

ist die Sperminsyntheseexpression bei ADMA-Infusion um etwa 20% größer, als bei Versuchstieren, die 5/6 nephrektomiert und nach 3 Wochen getötet wurden. Dies lässt sich als signifikant darstellen. Betrachtet man die

Expression bei 5/6 nephrektomierten Tieren, die nach 4 Wochen getötet wurden, lässt sich



Abbildung 16: Sperminthaseexpression im Hippocampus bei Versuchstieren mit 5/6 Nephrektomie

eine Verringerung der Sperminthaseexpression um ca. 10% gegenüber der Gruppe der Tiere mit ADMA-Infusion darstellen. Hier lässt sich kein signifikanter Unterschied im Vergleich der beiden Gruppen aufzeigen. Im Vergleich der Expression bei 0,9% NaCl-Infusion und 5/6 Nephrektomie, getötet nach 4 Wochen, ist allerdings wieder ein signifikanter Unterschied zu erkennen. Hier zeigt sich bei den 5/6 nephrektomierten Versuchstieren

eine Erhöhung der Expression um etwa 21%. Der Unterschied der Expressionswerte der Sperminthase bei den 5/6 nephrektomierten Versuchstieren, welcher im Vergleich der

Abbildungen 13 und 17 auftritt, kommt dadurch zustande, dass in Abbildung 17 die Gruppe der 5/6 Nephrektomierten Versuchstiere noch einmal in Subgruppen aufgespalten wurde. Die Sperminthaseexpression, welche in Abbildung 13 aufgezeigt ist, setzt sich aus den Expressionen der Sperminthase der

Versuchstiergruppen zusammen, welche nach 3 und nach 4 Wochen getötet wurden. Vergleicht man jetzt die beiden Subgruppen, also die 5/6 Nephrektomierten, getötet nach 3 Wochen und getötet nach 4 Wochen,

lässt sich auch ein Unterschied feststellen. Die Expression ist bei Versuchstieren, die nach 4 Wochen getötet wurden um noch einmal etwa 9% höher, als die Sperminthaseexpression bei Versuchstieren, die nach 3 Wochen getötet wurden.

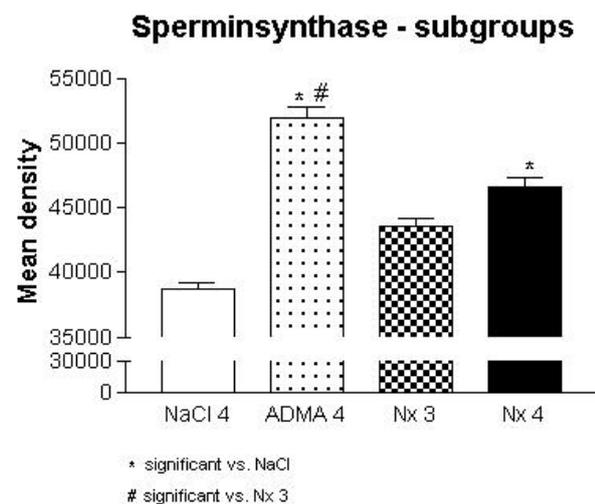


Abbildung 17: Sperminthaseexpression im Hippocampus in den einzelnen Subgruppen

NaCl 4=0,9% Natriumchloridlösung; n=10

ADMA 4=Asymmetrisches Dimethylarginin; n=10

Nx 3=5/6 Nephrektomie, Tötung nach 3 Wochen; n=8

Nx 4=5/6 Nephrektomie, Tötung nach 4 Wochen; n=5

4. Diskussion

Niereninsuffiziente Patienten sind signifikant häufiger von depressiver Verstimmung oder fulminanter depressiver Störung betroffen, als Patienten mit anderen schwerwiegenden chronischen Erkrankungen, wie Krebsleiden oder chronischen Herzerkrankungen [12]. In einer Untersuchung aus Ontario (Kanada) im Jahr 2005 wurden insgesamt 41701 Personen beider Geschlechter befragt, in wie weit bei ihnen eine chronische Erkrankung vorliegt und ob sie gelegentlich an einer depressive Verstimmung leiden. Es konnte gezeigt werden, dass Patienten mit chronisch erhöhten Blutdruckwerten nur zu 8,1% oder mit Diabetes nur zu 9,3% von depressiven Symptomen betroffen waren [40]. In einer Telefonumfrage in Deutschland zwischen Juli 2008 und Juni 2009 wurden insgesamt 9133 Patienten die älter als 50 Jahre waren, zu ihren Erkrankungen und Komorbiditäten befragt. Dabei wurde unterschieden zwischen Patienten mit und ohne Diabetes. Aus dieser Befragung geht hervor, dass die Patienten mit Diabetes deutlich häufiger von chronischen Rückenschmerzen (34,5%), hypertensiver Kreislaufkrankung (73,5%) oder Angina pectoris Symptomatik (28,5%) betroffen waren, als von Depression (8,6%) [41]. In Bezug auf andere chronische Erkrankungen, wie Fibromyalgie oder Bronchitis konnten in der Arbeit von Gadalla et al. allerdings auch deutlich höhere Prävalenzen (26,5% bzw. 16,9%) von depressiven Symptomen festgestellt werden [40]. In einer Studie, welche im April 2014 publiziert wurde, konnten die Wissenschaftler bei Patienten mit einem Fibromyalgiesyndrom eine deutlich gesteigerte Prävalenz von lebensmüden Gedanken feststellen. Dazu wurden 44 Patienten mit Fibromyalgie, 32 Patienten mit Rückenschmerzen und 50 gesunde Patienten hinsichtlich suizidaler Gedanken mit dem Beck-Depressions-Inventar-Fragebogen und hinsichtlich des Risikos für einen Suizid mit der Plutchik-Suizidalitätsrisiko-Skala befragt. Die Patienten mit Fibromyalgie hatten ein deutlich gesteigertes Risiko eines Suizides im Vergleich zu der gesunden Patientengruppe bzw. der mit Rückenschmerzen. 81% der Patienten mit Fibromyalgie zeigten ein ausgeprägtes Suizidalitätsrisiko, im Vergleich zu nur 8% der Befragten aus der Kontrollgruppe der Gesunden. Aus diesen Ergebnissen folgerten die Wissenschaftler, dass die Fibromyalgie nicht allein der Grund der gesteigerten Suizidalität sei, sondern dass besonders die sehr häufig auftretende Depression den entscheidenden Faktor hinsichtlich lebensmüder Bestrebungen bei den Patienten darstellt [42]. Vergleicht

man in Bezug auf diese Daten das Auftreten von Depressionen bei chronisch niereninsuffizienten Patienten anhand der Studie von Palmer et al. liegt hier die Prävalenz der Depression bei 20,3% [43]. Diese Tatsache zeigt, dass Depressionen bei chronischer Nierenschädigung ebenso häufig, wenn nicht sogar häufiger als bei anderen chronischen Erkrankungen auftreten. Diese Begleiterscheinung bei schwer nierenkranken Personen hat eine große Auswirkung auf das Outcome und die krankheitsbezogene Lebensqualität. Es zeigt sich beispielsweise eine erhöhte Mortalität bei Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz und fulminanter Depression [44]. Diese Tatsache stellt nicht nur für die Patienten, sondern auch für das Gesundheitssystem eine besondere Belastung dar. Niereninsuffiziente Patienten mit Depression werden häufiger ins Krankenhaus eingeliefert, als nichtdepressive nierengeschädigte Patienten [7]. Die Ursachen dafür sind mannigfaltig und zum Teil auch noch nicht aufgedeckt. Mögliche Erklärungsversuche sind in verschiedenen Studien veröffentlicht worden [45–47]. Eine mögliche Erklärung liefert beispielsweise die Studie von Davison et al., welche davon ausgeht, dass chronischer Schmerz deutlich in die Depressionsentstehung eingebunden ist. In dieser Studie wurden 205 kanadische hämodialysepflichtige Patienten mit einem Schmerzfragebogen (Brief Pain Inventory), einem Depressionsfragebogen (Beck Depression Inventory) und einem Schlaffragebogen (Pittsburgh Sleep Quality Index) hinsichtlich ihrer individuellen Belastung befragt. Die Ergebnisse der Studie zeigen ein deutliches Bild. Hämodialysepflichtige Patienten mit milden oder keinen Schmerzen berichten signifikant weniger über depressive Symptomatik, als hämodialysepflichtige Patienten mit moderaten oder stärkeren Schmerzen. Nur etwa 18% der Patienten mit milden oder keinen Schmerzen zeigten eine Depression, im Gegensatz dazu 34% der Patienten mit stärkeren Schmerzen [45]. Die Ursachen der Depressionsentstehung sind sehr komplex und bis heute nicht vollständig geklärt. Angenommen wird eine Kombination aus biologischen, genetischen und psychosozialen Faktoren. Ausschlaggebend für die Annahme von genetischen Ursachen im Rahmen der Depressionsentstehung waren vor allen Zwillingsstudien. In einem Review-Artikel von Sullivan et al. aus dem Jahre 2000 konnte durch die Analyse mehrerer Zwillings- und Familienstudien die familiäre Häufung im Auftreten von Depressionen dargelegt werden [48]. Auch hinsichtlich psychosozialer Ursachen wurden umfangreiche Untersuchungen durchgeführt. Dabei scheinen in besonderer Weise frühkindliche Traumatisierungen wie Kindesmissbrauch und Vernachlässigung [49], sowie verschiedenste Verlusterlebnisse,

insbesondere von Bezugspersonen [50] an der Depressionsentstehung beteiligt zu sein. Bestimmte weitere Umwelteinflüsse wie Ehekonflikte der Eltern oder niedriger sozioökonomischer Status sind allen Anschein nach weitere Einflussfaktoren, die bei traumatisierten Kindern zu einer deutlich erhöhten Depressionsanfälligkeit im Erwachsenenalter führen [51]. Seit Jahrzehnten stellt die Monoaminmangelhypothese die Grundlage der pharmakologischen Behandlung der Depression dar [52]. Diese Monoamine sind Serotonin, Dopamin und Noradrenalin. Die derzeit wissenschaftlich anerkannte pharmakologische Therapie der Depression fußt auf dieser Hypothese. Eine Vielzahl von Präparaten sind auf dem Markt, die die alleinige oder kombinierte präsynaptische Konzentration von Serotonin, Noradrenalin und Dopamin erhöhen und dadurch sehr gute antidepressive Effekte ausweisen [53]. Allerdings scheint nicht nur allein das Monoaminsystem an der Depressionsentstehung beteiligt zu sein. Kugaya et al. konnten in einer Übersichtsarbeit von 2005 zeigen, dass auch Glutamat und andere Neurotransmitter wie Gamma-Aminobuttersäure mit ihren Rezeptorregelkreisen einen Anteil an der Entstehung von Depressionserkrankungen haben [54]. In den Regelkreis des Glutamates ist auch der NMDA-Rezeptor eingeschlossen. Anscheinend scheint der NMDA-Rezeptor auch in die Depressionsentstehung eingebunden. In einer 2008 durchgeführten Studie von Maeng et al. wurde ein akuter antidepressiver Effekt nach Behandlung mit NMDA-Rezeptor-Antagonisten wie Ketamin bei Mäusen, welche anfänglich ein depressives Verhalten aufwiesen, aufgezeigt. Dabei wurden die Versuchstiere durch wiederholte Stromschläge in einen Zustand der gelernten Hilflosigkeit gebracht, sowie die Immobilisation durch erzwungenes Schwimmen getestet. Ebenso wurde das Vermeidungsverhalten der Mäuse bezüglich der Verabreichung der Stromschläge beobachtet. Es konnte gezeigt werden, dass Mäuse, die mit Ketamin behandelt worden waren im Vergleich zur Kontrollgruppe, welche mit NaCl behandelt worden waren, signifikant weniger Fluchtversuche benötigten, um sich den Stromschlägen zu entziehen [55]. Diese Studie lässt also die Vermutung zu, dass es außer den etablierten Ansichten zur Entstehung von Depressionen weitere molekulare Pathomechanismen der Depression gibt.

In dieser Dissertation sollte untersucht werden, ob die Enzyme Agmatinase und Sperminsynthase an der Entstehung der Depression bei nierengeschädigten Patienten beteiligt sind. Dabei wurden die Agmatinasekonzentrationen und Sperminsynthasekonzentrationen in Hippocampi chronisch niereninsuffizienter (5/6

nephrektomierten) Ratten untersucht. Die Ergebnisse wurden mit denen von Tieren aus zwei weiteren Gruppen verglichen. Eine Gruppe war die Kontrollgruppe, welche eine 0,9% NaCl-Lösung infundiert bekam und die andere Gruppe war jene, welche das Urämietoxin ADMA als Infusion erhielt. Die Untersuchung erfolgte durch immunhistochemische Anfärbung der Agmatinase und der Sperminsynthase in den Schnitten der Rattenhirne im Bereich des Hippocampus anhand eines Computerprogrammes durch Helligkeitsbestimmung.

Im Hinblick auf die Agmatinaseexpression in den Hippocampi von 5/6 nephrektomierten Ratten konnten in dieser Dissertation folgende Ergebnisse gewonnen werden: Es zeigte sich im Vergleich zu Ratten, die eine NaCl-Lösung infundiert bekamen, bei den 5/6 nephrektomierten Ratten zwar eine Erhöhung der Agmatinaseexpression von etwa 5%, jedoch war dieser Unterschied nicht signifikant. Viele Studien zeigen, dass die im Verlauf dieser Dissertation erwähnten Polyamine zum einen neuroprotektive, zum anderen aber auch neurotoxische Effekte aufweisen [56, 57]. Agmatinase ist ein Inaktivator des antidepressiv wirkenden Agmatin [22]. Ein Aspekt der Neurotoxizität ist die Interaktion mit dem schon beschriebenen NMDA-Rezeptor. Agmatin bindet an eine bestimmte Region dieses Rezeptors und weist hierdurch antidepressive Effekte auf [24]. Da Agmatin durch Agmatinase abgebaut wird, liegt der Schluss nahe, dass bei erhöhten Agmatinasespiegel ein depressionsfördernder Effekt zu erwarten ist. In der Studie von Bernstein et al. konnte festgestellt werden, dass die Agmatinasekonzentration in hippocampalen Interneuronen bei Patienten mit affektiven Störungen deutlich erhöht ist. Hier wurden 11 Gehirne von Patienten mit schwerer Depression oder bipolarer Störung untersucht. Sechs dieser Patienten starben durch Suizid. Die Kontrollgruppe bestand aus Gehirnen von 4 Frauen und 8 Männern, welche vor allem aufgrund von pulmonalen und kardialen Ereignissen starben. Keiner dieser Patienten in der Kontrollgruppe hatte nachweislich eine Niereninsuffizienz. Bei Patienten mit Depression wurden signifikant mehr Agmatinase-positive Neurone detektiert [22]. Zum jetzigen Zeitpunkt ist die Studienlage in Bezug auf die Agmatinasekonzentration bei niereninsuffizienten Patienten, sowie in weiteren Schluss bei Niereninsuffizienz und Depression sehr spärlich. Diese Dissertation versuchte hier eine Lücke zu schließen. Ob die gewonnenen Ergebnisse aus den Untersuchungen von Hippocampi 5/6 nephrektomierter Ratten auch auf das menschliche Hirn zutreffen, muss Bestandteil weiterer Untersuchungen sein. Die Agmatinase ist in den Argininzyklus eingeschlossen und kann aus Agmatin Putrescin synthetisieren [58]. Putrescin wird als Urämietoxin angesehen [59]. Die Konzentration von

Putrescin ist im Serum von Patienten mit Nierenschädigung erhöht [17]. Weiterhin konnte nachgewiesen werden, dass die Putrescinkonzentration im Frontalhirn bei Ratten die eine Putrescin-Injektion erhielten, stark anstieg. Diese Ratten zeigten im Folgenden auch Veränderungen in ihrem Verhalten, wie beispielsweise motorische Koordinationsschwierigkeiten. Dies ließ für die Wissenschaftler den Schluss zu, dass Putrescin ab einer bestimmten Konzentration toxische Wirkungen in den Rattenhirnen zeigt [60]. Hier lässt sich der Zusammenhang zur vorliegenden Dissertation schließen. Eine erhöhte Agmatinaseexpression könnte im Hirn, aufgrund eines erhöhten Abbaus des Agmatins, eine erhöhte Konzentration von Putrescin zur Folge haben. Dies wiederum könnte, da Putrescin eine toxische Wirkung im Versuch bei Rattenhirnen zeigt, auch in Bezug auf Depressionen eine Rolle spielen. Es ist durchaus denkbar, dass die Erhöhung des Urämietoxins Putrescin bei Niereninsuffizienz auch eine Anreicherung im Gehirn zur Folge hat. Inwieweit die Putrescinkonzentrationen im Serum und im Gehirn wirklich korrelieren ist unklar. Das Gleiche gilt für die Agmatinase. Es ist nicht klar, ob die Agmatinaseaktivität im Serum und im Gehirn niereninsuffizienter Patienten unterschiedlich ist. Ebenso ist der vermutete Zusammenhang zwischen der Expression der Agmatinase und der Konzentration von Putrescin im Gehirn nicht untersucht. Die Ergebnisse dieser Dissertation bezüglich einer erhöhten Aktivität der Agmatinase bei 5/6 nephrektomierten Ratten zeigen eine Tendenz, konnten aber nicht als signifikant festgestellt werden.

In dieser Dissertation konnten in Bezug auf die Sperminsyntheseexpression im Hippocampus von niereninsuffizienten Ratten folgende Beobachtungen gemacht werden: Im Vergleich zur Kontrollgruppe, also Ratten, die eine 0,9% NaCl-Lösung infundiert bekamen, zeigte sich bei den 5/6 nephrektomierten Ratten, welche nach 4 Wochen getötet wurden eine Expressionssteigerung der Sperminsynthese im Hippocampus um 21 %. Der Unterschied wurde noch deutlicher im Vergleich zu den Tieren aus der Kontrollgruppe und der Gruppe, die eine ADMA-Infusion erhielten. Die Expression der Sperminsynthese im Hippocampus der mit dem Urämietoxin ADMA behandelten Tiere war im Vergleich zur Kontrollgruppe um 34% erhöht. Beide Unterschiede sind statistisch signifikant. Die Sperminsynthese ist ebenso wie die Agmatinase in den Argininzyklus eingebunden. Dieses Enzym synthetisiert aus Spermidin, einem Produkt der enzymkatalysierten Reaktion von Putrescin mit der Spermidinsynthase, das Polyamin Spermin [5]. Somit besteht ein enger Zusammenhang zwischen den Enzymen Agmatinase und Sperminsynthese im Argininzyklus. Die Datenlage zur

Sperminsynthasekonzentration im Hippocampus von Patienten ist in Anlehnung an die Datenlage zur Agmatinase eher schwach. Die Studie von Igarashi et al. konnte im Hinblick auf die Produkte und Substrate der durch die Sperminsynthase katalysierten Reaktion einige Erkenntnisse liefern. Hier wurden Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz bezüglich der Plasmakonzentration von Putrescin, Spermidin und Spermin untersucht. Die Patienten wurden anhand ihrer Kreatininkonzentration im Plasma in 2 Versuchsgruppen unterteilt. Gruppe 1 bestand aus Patienten mit moderater Niereninsuffizienz (< 8mg Kreatinin/dl), die zweite Gruppe bestand aus Patienten mit schwerer Niereninsuffizienz (> 8mg Kreatinin/dl). In diesen Versuchsgruppen konnte im Vergleich zur Kontrollgruppe eine erhöhte Konzentration von Putrescin und erniedrigte Konzentrationen von Spermin und Spermidin im Blutplasma festgestellt werden [17]. Inwieweit diese Konzentrationen im Serum von niereninsuffizienten Patienten mit den Konzentrationen in deren Gehirnen korrelieren, ist unklar. Die Messung der Konzentrationen im Gehirn ist Aufgabe weiterer Untersuchungen. In einem Rattenmodell, bei dem durch chronischen Stress Anhedonie (Freudlosigkeit) erzeugt wurde, konnte gezeigt werden, dass es zu einem signifikanten Abfall der Konzentrationen an Putrescin, Spermin und Spermidin im Hippocampus kam [61]. Inwieweit dieser Zusammenhang auch auf das hier dargestellte Rattenmodell der chronischen Niereninsuffizienz zutrifft, ist unklar. Ziel dieser Dissertation war es, einen Aspekt dieses komplexen Zusammenspiels zu beleuchten. Die Untersuchung von Genedani et al. ist ein Anhaltspunkt in der vorliegenden Arbeit, die Sperminsynthaseexpression im Hippocampus zu untersuchen. Die erniedrigten Putrescin- und Spermidinkonzentrationen könnten durch eine erhöhte Aktivität und/oder erhöhte Expression der Sperminsynthase im Hippocampus erklärbar sein. Ob sich die Daten der erwähnten Arbeit von Igarashi et al. und der Arbeit von Genedani et al. kombinieren lassen, bleibt in weiteren Untersuchungen zu überprüfen. Grundsätzlich lässt sich aber hier ein Zusammenhang vermuten, denn sowohl bei chronischer Niereninsuffizienz als auch bei depressiver Verstimmung sind die Konzentrationen von Spermin und Spermidin erniedrigt. Unterschiede bestehen allerdings in den Körperkompartimenten, in denen die Konzentration dieser Polyamine gemessen wurde. Es besteht ein großer funktioneller Unterschied zwischen den Kompartimenten Gehirn und Serum. Daher sind die Daten nicht exakt vergleichbar. Putrescin zeigte in einem Versuch von Zomkowski et al. deutliche antidepressive Effekte. Es war sogar ein synergistischer Effekt bei Kombination mit dem antidepressiv wirkenden Agmatin zu eruieren. In dieser Studie wurden

Mäuse anhand von erzwungener Immobilität untersucht. Dabei konnte gezeigt werden, dass die Immobilitätszeit nach Injektion von Putrescin deutlich abfiel [62]. Dies lässt wiederum die Annahme zu, dass bei erhöhter Sperminsyntheseexpression das antidepressiv wirkende Putrescin schneller abgebaut wird und somit nicht mehr in antidepressiv wirkenden Konzentrationen vorliegt. Dieser Zusammenhang ist aber in Bezug auf niereninsuffiziente Patienten noch nicht untersucht worden. Daher war es Teil dieser Dissertation, diese Lücke zu schließen. Hier ist allerdings deutlich darauf hinzuweisen, dass diese Aussagen hypothetisch sind und weiterer Objektivierung bedürfen. Dabei erscheint es sinnvoll die Konzentrationen der Enzyme wie Sperminsynthase und Agmatinase als Absolutzahlen in Zusammenhang mit den Konzentrationen der Substrate und Produkte zu messen. In der vorliegenden Dissertation wurden lediglich relative Expressionswerte mittels Helligkeitsbestimmung ermittelt. Diese bilden allerdings nicht genaue Konzentrationen ab. Inwieweit die genannten Polyamine (besonders Putrescin, Spermidin und Spermin) mit Rezeptoren interagieren und ihren antidepressiven und depressionsfördernden Effekt ausüben ist unklar und bedarf weiterer Klärung. Es besteht zudem ein Widerspruch zwischen erhöhter Putrescinkonzentration bei chronisch niereninsuffizienten Patienten und erniedrigter Putrescinkonzentration bei depressiver Stimmungslage. Dieser Unterschied könnte mit den unterschiedlichen Kompartimenten, in denen die Konzentrationen bestimmt wurden, erklärt werden. Bezug nehmend auf die Hypothesen zur Expression der Agmatinase und der Konzentration von Putrescin wurde in den vorigen Abschnitten dieser Arbeit postuliert, dass Putrescin sich durch erhöhte Agmatinaseexpression im Gehirn anreichern könnte und dadurch eine neurotoxischen Wirkungen in Bezug auf die Depressionsentstehung ausübt. Hierbei wurde das System der Agmatinase hypothetisch isoliert, also von Substrat Agmatin bis Produkt Putrescin, betrachtet. Eine weiter folgende Betrachtung entfiel. Deshalb konnte im Abschnitt zur Expression der Sperminsynthase im Hippocampus niereninsuffizienter Ratten eine gegensätzliche Annahme getätigt werden. Hier wird in der Dissertation angenommen, dass Putrescin neuroprotektive Effekte ausweist und im Verlauf durch die Sperminsynthase abgebaut wird und dadurch die Neuroprotektion abgeschwächt ist. Diese Hypothese basiert wiederum auf der Annahme, dass das Enzymsystem der Sperminsynthase mit samt seiner Produkte und Substrate hypothetisch isoliert betrachtet wird. Ein weiterer Erklärungsversuch dieser divergenten Annahme ist die Möglichkeit der dosisabhängigen Neurotoxizität bzw. Neuroprotektion. Beispielsweise zeigt

der Neurotransmitter Glutamat, der entscheidend an der Signalübertragung des NMDA-Rezeptors beteiligt ist, so eine Divergenz. In der Studie von Mitani et al. zeigte sich bei Patienten mit Depression signifikant höhere Serumspiegel von Glutamat als bei der Kontrollgruppe ohne depressive Symptomatik [63]. Im Gegensatz dazu ist aber ein normwertiger Glutamatspiegel für die normale neuronale Entwicklung und Differenzierung von besonderer Bedeutung [64]. Dieses Beispiel zeigt also sehr eindrücklich die Dosisabhängigkeit der Neuroprotektion versus der Neurotoxizität. Damit könnte man die Tatsache untermauern, dass Putrescin in niedrigen Konzentrationen eher neuroprotektiv und in höheren Konzentrationen eher neurotoxisch wirkt. Ob diese Angaben bezüglich des Serumspiegels des Glutamats auch auf die Konzentrationen im Gehirn zu übertragen sind und ob man die Dosisabhängigkeit des Neurotransmitters Glutamat auch auf eine Dosisabhängigkeit des Putrescins übertragen kann ist allerdings fraglich. Eine Arbeit von Hashimoto et al. konnte allerdings zeigen, dass eine Übertragbarkeit der erhöhten Glutamatkonzentrationen im Serum auch auf das Gehirn möglich ist. Hier war es möglich bei Patienten mit bipolarer Störung oder erheblicher Depression auch eine Konzentrationserhöhung des Glutamates im Frontalkortex bei erhöhtem Glutamatspiegel im Blutserum zu detektieren [65].

Ein weiteres Ergebnis dieser Dissertation ist, dass die Sperminsyntheseexpression bei alleiniger ADMA-Infusion deutlich höher ist, als bei Nephrektomie. Dieser Unterschied lässt sich bei der Agmatinase allerdings nicht feststellen. Die ADMA-Konzentration ist bei Niereninsuffizienz stark erhöht [66] und ADMA wird bei der Proteindegradation aktiv gebildet [67]. ADMA greift in den Stickstoffmonooxid (NO) -zyklus ein, indem es die nicht spezifische NO-Synthase und auch Arginin hemmt und damit eine relative spezifische Niereninsuffizienz auslöst [38]. Stickstoffmonooxid (NO) ist ein entscheidender Faktor für die Kontrolle der renalen Funktionen. Durch die Hemmung der NO-Bildung wird ein renaler Bluthochdruck erzeugt [68] und die Salzexkretion gesenkt [69]. NO ist im weiteren Verlauf essentiell für die Argininsynthese. Im Verlauf der weiteren Umsetzung von Arginin entsteht Agmatin, Spermidin und auch Spermin [70]. Eine niedrige Stickstoffmonooxidkonzentration, bedingt durch ADMA-Infusion oder das Ansteigen der ADMA-Spiegel bei Niereninsuffizienz, könnte zu einer erhöhten Sperminsyntheseexpression im Hippocampus führen, da die Sperminsyntheseaktivität anscheinend durch das Vorhandensein seiner Substrate, nämlich Spermidin und das im Polyaminzyklus vorher entstehende Agmatin, reguliert ist [71]. Sind

wenig Substrate, also Polyamine, welche NO-abhängig gebildet werden, für die Sperminsynthese vorhanden, steigt die Expression der Sperminsynthese an. Diese These stützt eine Untersuchung von Pegg et al. von 1992. Hier konnte gezeigt werden, dass eins der beiden Schlüsselenzyme der Polyaminsynthese, die Ornithin Decarboxylase (ODC), durch die vorhandenen Polyaminspiegel reguliert ist. Steigen die Polyaminspiegel kommt es zur Inhibition der ODC, sinken die Polyaminkonzentrationen steigt die Konzentration der ODC [72]. Dies könnte man eventuell auch auf die Sperminsynthese oder Agmatinase übertragen, da beide ebenso in den NO-abhängigen Polyaminzyklus eingebunden sind. Allerdings ist die Enzymstruktur und die Enzymklasse der ODC, welche zur Klasse der Decarboxylasen zählt, eine andere als die der Sperminsynthese, die zu den Transferasen gezählt wird [31, 73]. Eine weitere Limitation ist der Umstand, dass es unklar ist, ob man von Serumkonzentrationen der genannten Polyamine und Enzyme auch auf die Konzentrationen im Gehirn und noch spezifischer im Hippocampus schließen kann. Die höhere Sperminsyntheseexpression bei alleiniger ADMA-Infusion im Vergleich zur Nephrektomie könnte aber zeigen, dass die Expressionen der beteiligten Enzyme im Polyaminzyklus entscheidend NO-abhängig reguliert sind und damit ADMA als Urämietoxin einen spezifischeren Effekt auf die Sperminsynthese aufweist, als das bei Nephrektomie der Fall wäre. Bei Nephrektomie wird keine spezifische Niereninsuffizienz ausgelöst, sondern es kommt zum Nebeneinander vieler unterschiedlicher Einflussfaktoren, die bei alleiniger ADMA-Infusion anscheinend keinen Einfluss haben. Eine weitere Limitation dieser Dissertation ist die Tatsache, dass die untersuchten Ratten nicht hinsichtlich depressiver Symptome untersucht wurden. Es erfolgte eine alleinige Fixierung auf die Enzymexpressionen bei Niereninsuffizienz. Daher ist eine Untersuchung nierengeschädigter Ratten hinsichtlich depressiver Symptome mit gleichzeitiger Messung der Expression von Agmatinase und Sperminsynthese sinnvoll.

Mit dieser Dissertation konnte gezeigt werden, dass bestimmte Enzyme, vor allem die Sperminsynthese im Rahmen der Verstoffwechslung der Polyamine im Argininzyklus bei niereninsuffizienten Ratten deutlich höher im Hippocampus exprimiert zu detektieren waren, als bei den Vergleichstieren mit NaCl-Infusion. Diese Erkenntnis stellt die Grundlage für weitere wissenschaftliche Untersuchungen dar, mit der Aufgabe der weiteren Beleuchtung der Ursachen einer erhöhten Depressionshäufigkeit bei niereninsuffizienten Patienten. Diese Untersuchungen müssen die genauen Plasma- und intracerebralen Konzentrationen der einzelnen Polyamine in direkte Verbindung mit den Konzentrationen

der dazugehörigen Enzyme in der Verstoffwechslung selbiger bringen. Wichtig ist auch, dass die Ergebnisse der Studien mit Ratten hinsichtlich der Vergleichbarkeit mit dem Menschen zu validieren sind.

5. Zusammenfassung

Die chronische Nierenschädigung ist eine schwere, von vielen Symptomen begleitete Erkrankung. In den letzten Jahren durchgeführte Studien zeigten, dass die Depression oder depressive Verstimmung im Vergleich zu anderen schweren Allgemeinerkrankungen häufiger bei Patienten mit schwerer Nierenfunktionseinschränkung auftritt. Die Ursachen hierfür sind noch nicht ausreichend erforscht. Ein Ansatz der Betrachtung ist die Annahme, dass bestimmte Neuromodulatoren aus der Polyamingruppe und deren Entstehungs- und Abbauzyklen an der Depressionsentstehung bei chronisch niereninsuffizienten Patienten beteiligt sind. Dazu wurden in dieser Dissertation die Agmatinase- und Sperminsynthaseexpressionen im Hippocampus niereninsuffizienter Ratten untersucht. Diese beiden Enzyme sind in den Polyaminzyklus eingebunden und vermitteln den Ab- und Aufbau bestimmter Neuromodulatoren. Dazu zählen Agmatin, Putrescin, Spermidin und Spermin. Anhand der immunhistochemischen Darstellung der Agmatinase- und Sperminsynthaseexpressionen im Hippocampus von 5/6 nephrektomierten Ratten konnten folgende Erkenntnisse gewonnen werden: Im Vergleich zur Kontrollgruppe (4 Wochen NaCl-Infusion) konnte ein signifikanter Anstieg der Sperminsynthaseexpression im Hippocampus der niereninsuffizienten Ratten um 21% detektiert werden. Auch bei der Agmatinaseexpression im Hippocampus der 5/6 nephrektomierten Ratten konnte eine Erhöhung der Expression um 5% dargestellt werden, die allerdings nicht signifikant ist. Möglicherweise könnten diese Ergebnisse bestimmte Ansätze hinsichtlich der Erklärung der erhöhten Depressionshäufigkeit bei niereninsuffizienten Patienten beleuchten. Hier wurde sich in dieser Dissertation besonders auf die beteiligten Polyamine wie Agmatin und Putrescin bezogen, die in bestimmten Konzentrationen antidepressive Effekte aufweisen. Plausibel scheint eine, durch erhöhte Verstoffwechslung dieser Neuromodulatoren bei erhöhten Expressionen der besagten Enzyme, geringere antidepressive Wirkung der Polyamine. In die Interaktion in diesem komplexen Zusammenwirken der Substrate im Argininzyklus scheinen bestimmte Rezeptoren, wie der NMDA-Rezeptor eingebunden zu sein. Beispielsweise binden Agmatin und Putrescin an diesen Rezeptor und verändern damit seine Konformation. Dies könnte in der Depressionsentstehung eine Rolle spielen. Ziel war es, einen Teil des komplexen Zusammenspiels der unterschiedlichen Polyamine des

Argininzyklus mit ihren umsetzenden Enzymen zu beleuchten und einen Grundstein für weitere wichtige Untersuchungen im Rahmen dieser Thematik zu geben. Nun muss untersucht werden, ob Plasmakonzentration und hippocampale Konzentration der Enzyme und auch der beteiligten Polyamine bei niereninsuffizienten Patienten zu vergleichen sind und in welchem Maße Konzentrationen von Enzymen mit Konzentrationen ihrer Substrate zusammenhängen.

6. Literaturverzeichnis

1. <http://biocyc.org/META/new-image?type=PATHWAY&object=PWY-40&detail-level=2&ENZORG=TAX-9606>. *Zuletzt geprüft am 25.06.2015*.
2. <http://www.uscnk.com/directory/Agmatine-Ureohydrolase%28AGMAT%29-8664.htm>. *Zuletzt geprüft am 25.06.2015*.
3. <http://biocyc.org/HUMAN/NEW-IMAGE?type=PATHWAY&object=ARGSPECAT-PWY&detail-level=3>. *Zuletzt geprüft am 25.06.2015*.
4. Pegg A E, Michael A J (2010). Spermine synthase. *Cell Mol Life Sci* 67(1): 113–121.
5. Turecki G (2013). Polyamines and suicide risk. *Mol Psychiatry* 18(12): 1242–1243.
6. Coresh J, Selvin E, Stevens L A, et al. (2007). Prevalence of Chronic Kidney Disease in the United States. *JAMA* 298(17): 2038-47.
7. Lopes A A, Bragg J, Young E (2002). Dialysis Outcomes and Practice Patterns Study (DOPPS): Depression as a predictor of mortality and hospitalization among hemodialysis patients in the United States and Europe. *Kidney Int*: 62:199–207.
8. Go A S, Chertow G M, Fan D (2004). Chronic kidney disease and the risks of death, cardiovascular events, and hospitalization. *N Engl J Med*: 351:1296–1305.
9. Walters B A, Hays R D, Spritzer K L (2002). Health-related quality of life, depressive symptoms, anemia, and malnutrition at hemodialysis initiation. *Am J Kidney Dis*: 40:1185–1194.
10. Hedayati S S, Grambow S C, La Szczech (2005). Physician-diagnosed depression as a correlate of hospitalizations in patients receiving long-term hemodialysis. *Am J Kidney Dis*: 46:642–649.
11. Ibrahim S, El Salamony O (2008). Depression, quality of life and malnutrition-inflammation scores in hemodialysis patients. *Am J Nephrol*: 28:784–791.
12. Kimmel P L, Cukor D, Cohen S D, et al. (2007). Depression in endstage renal disease patients: a critical review. *Adv Chronic Kidney Dis*: 14(4):328–334.
13. Miller A H, Maletic V, Raison C L (2009). Inflammation and Its Discontents: The Role of Cytokines in the Pathophysiology of Major Depression. *Biological Psychiatry* 65(9): 732–741.
14. Stenvinkel P (2002). Inflammation in end-stage renal failure: could it be treated? *Nephrology Dialysis Transplantation* 17: 33–38.
15. Himmelfarb J (2008). Oxidative Stress in Hemodialysis. *Contrib Nephrol*: 161:132-137.
16. Hsu H-J, Yen C-H, Chen C-K, et al. (2012). Association between uremic toxins and depression in patients with chronic kidney disease undergoing maintenance hemodialysis. *General Hospital Psychiatry* (2012), <http://dx.doi.org/10.1016/j.genhosppsych.2012.08.009>.
17. Igarashi K, Ueda S, Yoshida K, et al. (2006). Polyamines in renal failure. *Amino Acids* 31(4): 477–483.
18. Fiori L M, Turecki G (2008). Implication of the polyamine system in mental disorders. *Journal of Psychiatry and Neuroscience* 33 (2): 102–110.
19. Bernstein H-G, Derst C, Stich C, et al. (2011). The agmatine-degrading enzyme agmatinase: a key to agmatine signaling in rat and human brain? *Amino Acids* 40(2): 453–465.

20. Iyer R K, Kim H K, Tsoa R W, et al. (2002). Cloning and Characterization of Human Agmatinase. *Molecular Genetics and Metabolism* 75(3): 209–218.
21. Reis D R S (1998). Agmatine: a novel neurotransmitter. *Adv Pharmacol*(42): 645–649.
22. Bernstein H-G, Stich C, Jäger K, et al. (2012). Agmatinase, an inactivator of the putative endogenous antidepressant agmatine, is strongly upregulated in hippocampal interneurons of subjects with mood disorders. *Neuropharmacology* 62(1): 237–246.
23. Ates-Alagoz Z, Adejare A (2013). NMDA Receptor Antagonists for Treatment of Depression. *Pharmaceuticals* 6(4): 480–499.
24. Olmos G, DeGregorio-Rocasolano N, Regalado M P, et al. (1999). Protection by imidazol(ine) drugs and agmatine of glutamate-induced neurotoxicity in cultured cerebellar granule cells through blockade of NMDA receptor. *British Journal of Pharmacology*(127): 1317–1326.
25. Zomkowski A, Hammes L., Lin J., et al. (2002). Agmatine produces antidepressant-like effects in two models of depression in mice. *NeuroReport*(13): 387–391.
26. McGuffin P, Knight J, Breen G, et al. (2005). Whole genome linkage scan of recurrent depressive disorder from the depression network study. *Hum. Mol. Genet*(14): 3337-3345.
27. Prof. Dr. Dr. W. H. Hörl F (2010). Urämie - was ist das? *Nephro-News Forum für Nephrologie und Hypertensiologie* 12(5/10): 1–7.
28. Schophuizen C M S, Wilmer M J, Jansen J, et al. (2013). Cationic uremic toxins affect human renal proximal tubule cell functioning through interaction with the organic cation transporter. *Pflugers Arch - Eur J Physiol* 465 (12): 1701-1714.
29. Klempan T A, Rujescu D, Mérette C, et al. (2009). Profiling brain expression of the spermidine/spermine N1 -acetyltransferase 1 (SAT1) gene in suicide. *Am J Med Genet* 150(7): 934–943.
30. Pegg A E, Wang X (2009). Mouse models to investigate the function of spermine. *Communicative & Integrative Biology* 2(3): 271–274.
31. Schwartz C E, Wang X, Stevenson R E, Pegg A E (2011). Spermine synthase deficiency resulting in X-linked intellectual disability (Snyder-Robinson syndrome). *Methods Mol Biol.* 720: 437-45.
32. Ragnarsson L, Mortensen M, Dodd P R, et al. (2002). Spermine modulation of the glutamate nmda receptor is differentially responsive to conantokins in normal and Alzheimer's disease human cerebral cortex. *Journal of Neurochemistry*(81): 765–779.
33. Otake K, Ruggiero D, Regunathan S, et al. (1998). Regional localization of agmatine in the rat brain: an immunocytochemical study. *Brain Res.* 87: 1–14.
34. Nadège Minois N, Carmona-Gutierrez D, Madeo F (2011). Polyamines in aging and disease. *AGING* 3(8): 716–732.
35. Chen G G, Fiori L M, Moquin L, et al. (2010). Evidence of Altered Polyamine Concentrations in Cerebral Cortex of Suicide Completers. *Neuropsychopharmacology* 35(7): 1477–1484.
36. Sakata K, Kashiwagi K, Sharmin S, et al. (2003). Increase in putrescine, amine oxidase, and acrolein in plasma of renal failure patients. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 305(1): 143–149.
37. Bahlmann F H (2004). Low-Dose Therapy With the Long-Acting Erythropoietin Analogue Darbepoetin Alpha Persistently Activates Endothelial Akt and Attenuates Progressive Organ Failure. *Circulation* 110(8): 1006–1012.
38. Kielstein J T, Zoccali C (2005). Asymmetric Dimethylarginine: A Cardiovascular Risk Factor and a Uremic Toxin Coming of Age? *Am J Kidney Dis*(46): 186–202.

39. Rasband W. *Image J* : National Institutes of Health, <http://imagej.nih.gov/ij/>. Zuletzt geprüft am 25.06.2015.
40. Gadalla T (2008). Association of comorbid mood disorders and chronic illness with disability and quality of life in Ontario, Canada. *Chronic Dis Can* 28(4): 148–154.
41. Du Y, Heidemann C, Gößwald A, et al. (2013). Prevalence and comorbidity of diabetes mellitus among non-institutionalized older adults in Germany - results of the national telephone health interview survey 'German Health Update (GEDA)' 2009. *BMC Public Health* 13: 166.
42. Jimenez-Rodríguez I, Garcia-Leiva J M, Jimenez-Rodríguez B M, et al. (2014). Suicidal ideation and the risk of suicide in patients with fibromyalgia: a comparison with non-pain controls and patients suffering from low-back pain. *Neuropsychiatr Dis Treat* 10: 625–630.
43. Palmer S C, Vecchio M, Craig J C, et al. (2013). Association between depression and death in people with CKD: a meta-analysis of cohort studies. *Am J Kidney Dis* 62(3): 493–505.
44. Jain N, Trivedi M H, Rush A J, et al. (2013). Rationale and design of the Chronic Kidney Disease Antidepressant Sertraline Trial (CAST). *Contemp Clin Trials* 34(1): 136–144.
45. Davison S N, Jhangri G S (2005). The Impact of Chronic Pain on Depression, Sleep, and the Desire to Withdraw from Dialysis in Hemodialysis Patients. *Journal of Pain and Symptom Management* 30(5): 465–473.
46. Rothermundt M, Arolt V, Peters M, et al. (2001). Inflammatory markers in major depression and melancholia. *Journal of Affective Disorders* 63(1-3): 93–102.
47. Friend R, Hatchett L, Wadhwa N K, et al. (1997). Serum albumin and depression in end-stage renal disease. *Adv Perit Dial* 13: 155–157.
48. Sullivan P F, Neale M C, Kendler K S (2000). Genetic epidemiology of major depression: review and meta-analysis. *Am J Psychiatry* 157(10): 1552–1562.
49. Brown J, Cohen P, Johnson J G, et al. (1999). Childhood abuse and neglect: specificity of effects on adolescent and young adult depression and suicidality. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* 38(12): 1490–1496.
50. Brent D A, Perper J A, Moritz G, et al. (1993). Psychiatric impact of the loss of an adolescent sibling to suicide. *J Affect Disord* 28(4): 249–256.
51. Fergusson D M, Horwood L J, Lynskey M T (1996). Childhood sexual abuse and psychiatric disorder in young adulthood: II. Psychiatric outcomes of childhood sexual abuse. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* 35(10): 1365–1374.
52. Freis E D (1954). Mental depression in hypertensive patients treated for long periods with large doses of reserpine. *N Engl J Med* 251(25): 1006–1008.
53. Anderson I M (2013). Pharmacological treatment of unipolar depression. *Current topics in behavioral neurosciences* 14: 263–289.
54. Kugaya A, Sanacora G (2005). Beyond monoamines: glutamatergic function in mood disorders. *CNS Spectr* 10(10): 808–819.
55. Maeng S, Zarate C A, Du J, et al. (2008). Cellular Mechanisms Underlying the Antidepressant Effects of Ketamine: Role of α -Amino-3-Hydroxy-5-Methylisoxazole-4-Propionic Acid Receptors. *Biological Psychiatry* 63(4): 349–352.
56. Shirhan M, Mochhala S, Ng P-Y, et al. (2004). Spermine reduces infarction and neurological deficit following a rat model of middle cerebral artery occlusion: a magnetic resonance imaging study. *Neuroscience* 124(2): 299–304.
57. Segal J A, Skolnick P (2000). Spermine-Induced Toxicity in Cerebellar Granule Neurons Is Independent of Its Actions at NMDA Receptors. *Journal of Neurochemistry* 74(1): 60–69.

58. Agostinelli E, Marques, M. P. M., Calheiros R, et al. (2010). Polyamines: fundamental characters in chemistry and biology. *Amino Acids* 38(2): 393–403.
59. Duranton F, Cohen G, Smet R de, et al. (2012). Normal and pathologic concentrations of uremic toxins. *J Am Soc Nephrol* 23(7): 1258–1270.
60. Vera N de, Serratosa J, Artigas F, et al. (1992). Toxic effects of putrescine in rat brain: Polyamines can be involved in the action of excitotoxins. *Amino Acids*(3): 261–269.
61. Genedani S, Saltini S, Benelli A, et al. (2001). Influence of SAME on the modifications of brain polyamine levels in an animal model of depression. *Neuroreport* 12(18): 3939–3942.
62. Zomkowski A D, Santos, Adair Roberto S., Rodrigues, Ana Lúcia S. (2006). Putrescine produces antidepressant-like effects in the forced swimming test and in the tail suspension test in mice. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry* 30(8): 1419–1425.
63. Mitani H, Shirayama Y, Yamada T, et al. (2006). Correlation between plasma levels of glutamate, alanine and serine with severity of depression. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry* 30(6): 1155–1158.
64. Coyle J T, Leski M, Morrison J H (2002). The diverse roles of l-glutamic acid in brain signal transduction. *Neuropsychopharmacology — The Fifth Generation of Progress* PA: 71–90.
65. Hashimoto K, Sawa A, Iyo M (2007). Increased levels of glutamate in brains from patients with mood disorders. *Biol Psychiatry* 62(11): 1310–1316.
66. Leone A, Moncada S, Vallance P, et al. (1992). Accumulation of an endogenous inhibitor of nitric oxide synthesis in chronic renal failure. *The Lancet* 339(8793): 572–575.
67. McBride A E, Silver P A (2001). State of the Arg: Protein Methylation at Arginine Comes of Age. *Cell* 106(1): 5–8.
68. Persson P B (2002). Nitric oxide in the kidney. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology* 283(5): R1005-7.
69. Kielstein J T, Impraim B, Simmel S, et al. (2004). Cardiovascular effects of systemic nitric oxide synthase inhibition with asymmetrical dimethylarginine in humans. *Circulation* 109(2): 172–177.
70. Flynn N E, Meininger C J, Haynes T E, et al. (2002). The metabolic basis of arginine nutrition and pharmacotherapy. *Biomed Pharmacother* 56(9): 427–438.
71. Pegg A E, Poulin R, Coward J K (1995). Use of aminopropyltransferase inhibitors and of non-metabolizable analogs to study polyamine regulation and function. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 27(5): 425–442.
72. Pegg A E, McCann P P (1992). S-adenosylmethionine decarboxylase as an enzyme target for therapy. *Pharmacol Ther* 56(3): 359–377.
73. Pegg A E, Shantz L M, Coleman C S (1994). Ornithine decarboxylase: structure, function and translational regulation. *Biochem Soc Trans* 22(4): 846–852.

7. Thesen

1. Die chronische Nierenschädigung nimmt hinsichtlich Inzidenz und Prävalenz weltweit kontinuierlich zu. In Deutschland gibt es derzeit knapp 70.000 Dialysepatienten. Einer von fünf Menschen mit einer chronischen Nierenerkrankung ist depressiv und dies schon lange vor dem Beginn einer Langzeit-Dialyse.
2. Die chronische Niereninsuffizienz ist eine große Belastung für das Gesundheitssystem. Depressionen als Begleiterkrankungen verschlechtern die Prognose der schweren Nierenerkrankung.
3. Die Ursachen für die erhöhte Depressionsrate bei Niereninsuffizienz sind mannigfaltig und noch nicht vollständig geklärt. Das Polyaminsystem mit seinen beteiligten Substraten, Produkten und Enzymen ist in dieses komplexe Zusammenspiel eingeschlossen.
4. Es ist bekannt, dass Agmatinasekonzentrationen im Gehirn bei Depressionen erhöht sind. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass es auch bei niereninsuffizienten Ratten zu einer Erhöhung der Agmatinaseexpression im Hippocampus kommt.
5. Agmatinase und Sperminsynthase sind Enzyme des Argininzyklus. In der vorliegenden Arbeit konnte eine signifikante Erhöhung der Sperminsynthaseexpression im Hippocampus der niereninsuffizienten Ratten gefunden werden.
6. ADMA als Urämietoxin löst eine spezifische Niereninsuffizienz aus. Es zeigt sich ebenso eine erhöhte Agmatinase- und Sperminsynthaseexpression im Gehirn von ADMA-infundierten Ratten im Rahmen dieser Dissertation.
7. Erhöhte Agmatinase- und Sperminsynthaseexpressionen beeinflussen die Konzentrationen ihrer Substrate, welche als Neuromodulatoren gelten und an der Depressionsentstehung maßgeblich beteiligt sind.

Lebenslauf (Curriculum vitae)

Felix Stein

Dorfstraße 15a
09236 Claußnitz

Geburtsdatum und Geburtsort:

02.09.1990 in Burgstädt

Hochschulbildung

Seit 28.06.2015	3. Tertial Praktisches Jahr Chirurgie Klinikum Chemnitz gGmbH
09.03.2015 – 26.06.2015	2. Tertial Praktisches Jahr Innere Medizin Klinikum Chemnitz gGmbH
07.11.2014 – 08.03.2015	1. Tertial Praktisches Jahr Wahlfach Anästhesie Universitätsklinikum Halle
08./09./10.10.2014	1. Abschnitt der 2. Ärztlichen Prüfung (Note: gut)
19.09.2011	Mündlich-praktischer Teil des Ersten Abschnittes der Ärztlichen Prüfung (Note: gut)
24.08.2011	Schriftlicher Teil des Ersten Abschnittes der Ärztlichen Prüfung (Note: befriedigend)

seit 10/2009 Studium der Humanmedizin an der Medizinischen Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle Wittenberg

Schulbildung

Schulabschluss Städtisches Gymnasium Mittweida
2009 Allgemeine Hochschulreife (Note: 1,1)

Schullaufbahn

2001 - 2009 Städtisches Gymnasium Mittweida

1997 - 2001 Grundschule Claußnitz

Famulaturen

08-09/2013 Diakoniekrankenhaus Chemnitzer Land
Diakomed gGmbH
Allgemein- und Visceralchirurgie

03-04/2013 Allgemeinmedizin
Praxis Dipl. med. Petra Röhr
Am Sonnenhang 4, 09236 Claußnitz

08-09/2012 Diakoniekrankenhaus Chemnitzer Land
Diakomed gGmbH
Allgemein- und Visceralchirurgie

03-04/2012

Allgemeinmedizin
Praxis Dipl. med. Petra Röhr
Am Sonnenhang 4, 09236 Claußnitz

Praktika

Seit 03/2013

Regelmäßige Notarzthospitation
Rettungswache 09212 Limbach-Oberfrohna
(NÄ Cordula Probst, Fachärztin für
Chirurgie/Notfallmedizin; OÄ Dr. med. Katrin Slany,
Fachärztin für Anästhesie, Intensivmedizin und
Notfallmedizin)

Rettungswache 09356 Lichtenstein (NÄ Kathleen
Dittrich-Ueberfeld, Fachärztin für Anästhesie,
Intensivmedizin und Notfallmedizin)

07/2009 – 10/2009

Pflegepraktikum
Gastroenterologie Station 81
Klinikum Chemnitz gGmbH

Sonstiges

10/2011 – 01/2012

Studentische Hilfskraft im Präparierkurs
Institut für Anatomie und Zellbiologie
Medizinische Fakultät der Martin-Luther-Universität
Halle-Wittenberg
(Leitung Präparierkurs: Prof. Dr. med. Heike Kielstein)

Sprachkenntnisse

Englisch Grundkenntnisse

Latein Grundkenntnisse

Claußnitz, den 12.10.2016

Felix Stein

Selbstständigkeitserklärung

Ich erkläre, dass ich die der Medizinischen Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg eingereichte Dissertation mit dem Titel

Hippocampale Expression von Agmatinase und Sperminsynthase bei 5/6 nephrektomierten Ratten – einem Modell der chronischen Nierenschädigung

im Institut für Anatomie und Zellbiologie der Medizinischen Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg unter Betreuung von Frau Prof. Dr. med. Heike Kielstein und PD Dr. rer. nat. Kristin Jäger ohne sonstige Hilfen und bei der Abfassung der Dissertation keine anderen, als die dort aufgeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Die Gelegenheit zum vorliegenden Promotionsverfahren ist mir nicht kommerziell vermittelt worden. Insbesondere habe ich keine Organisation eingeschaltet, die gegen Entgelt Betreuerinnen und Betreuer für die Anfertigung von Dissertationen sucht oder die mir obliegenden Pflichten hinsichtlich Prüfungsleistungen für mich ganz oder teilweise erledigt.

Claußnitz, den 12.10.2016

Felix Stein

Erklärung über frühere Promotionsversuche

Ich erkläre, dass ich die der Medizinischen Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg eingereichte Dissertation mit dem Titel

Hippocampale Expression von Agmatinase und Sperminsynthase bei 5/6 nephrektomierten Ratten – einem Modell der chronischen Nierenschädigung

im Institut für Anatomie und Zellbiologie der Medizinischen Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg unter Betreuung von Frau Prof. Dr. med. Heike Kielstein und PD Dr. rer. nat. Kristin Jäger bisher an keiner in- und ausländischen Medizinischen Fakultät zur Dissertation vorgelegt habe, sowie bisher kein Gesuch zur Zulassung einer Promotion an einer in- und ausländischen Medizinischen Fakultät eingereicht habe.

Claußnitz, den 12.10.2016

Felix Stein

Danksagung

Ich danke recht herzlich dem Institutsdirektor des Institutes für Anatomie und Zellbiologie der Medizinischen Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Herrn **Prof. Dr. med. Dr. agr. Bernd Fischer**, für die Möglichkeit, in seinem Institut meine Dissertation zu verfassen.

Ein besonderer Dank gilt meiner Doktormutter, Frau **Prof. Dr. med. Heike Kielstein** für die Überlassung des Themas der vorliegenden Dissertation und ihrer immer konstruktiven und herzlichen Begleitung der Arbeit, sowie die ständige Begleitung und Hilfestellung im Rahmen der Fertigstellung meiner Dissertation.

Weiterhin gilt mein Dank Frau **PD Dr. rer. nat. Kristin Jäger** für die ebenfalls fachliche und konstruktive Unterstützung.

Für die Hilfe bei der Probenanfertigung und Färbung der Rattenhirnpräparate danke ich recht herzlich der MTA **Susanne Kuhlmann**.

Frau **Fachärztin Cordula Probst**, Frau **Fachärztin Kathleen Dittrich-Ueberfeld** und Frau **Oberärztin Dr. med. Katrin Slany** danke ich für die ehrliche und freundliche Kritik hinsichtlich bestimmter Aspekte meiner Dissertation und die Möglichkeit, mich immer an sie wenden zu können.

Ganz besonders herzlich möchte ich mich bei meinen **Eltern**, meinem **Bruder** und meinem **Großeltern** bedanken. Hier fand ich Verständnis und Rückhalt. Sie unterstützten mich im Studium und in allen anderen Lebenslagen.

Gewidmet

meinen Eltern, Großeltern und meinen besten Freunden,

die mich stets unterstützen