

Universitätsklinikum Hamburg Eppendorf
Zentrum für Innere Medizin
III. Medizinische Klinik und Poliklinik (Nephrologie,
Rheumatologie - Nierentransplantation - Arbeitsbereich
Endokrinologie/Diabetologie)
Direktor: Professor Dr. med. R.A.K. Stahl

Inflammation und Fibrose in der stenosierten Niere unter antihypertensiver Therapie bei renovaskulärer Hypertonie

Dissertation zum Erlangen des Doktorgrades
im Fachbereich Medizin der Universität Hamburg

Vorgelegt von
Saloomeh Sadaghiani

Hamburg, Oktober 2008

Inhaltsverzeichnis

	Seite
X. Abstrakt	3
1. Einleitung	
1.1. Chronisch progressive Nierenerkrankungen.....	4
1.2. Angiotensin-Konversionsenzym-Hemmer (ACE-Hemmer).....	4
1.3. Die Neutrale Endopeptidase.....	4
1.4. Vasopeptidase-Hemmer.....	5
1.5. Angiotensin-Konversionsenzym-Hemmer (ACE-Hemmer) und Nierenarterienstenose.....	5
1.6. Die Th1- und Th2-induzierte Immunantwort.....	5
1.7. Ziel.....	6
2. Methoden	
2.1. Tierkollektiv, Tierhaltung, Ernährung.....	7
2.2. Die Klipp-Operation.....	7
2.3. Blutdruckmessung.....	7
2.4. Tiergruppen.....	8
2.5. Urinanalyse.....	8
2.6. Die renale Funktion.....	9
2.7. Die Entfernung der Nieren.....	9
2.8. Die Präparation von Total-RNA und Real-Time-PCR (RT-PCR)...	9
2.9. In situ Hybridisierung.....	10
2.10. Tissue Laser Microdissection.....	10
2.11. Histologie.....	10
2.12. Matrixmetalloproteinasen (MMPs).....	11
2.13. Statistische Analyse.....	11
3. Ergebnisse	
3.1. Generelle Charakteristika.....	12
3.2. Blutdruck.....	13
3.3. Renale morphologische Veränderungen.....	14
3.4. Immunhistochemische Charakteristika von intrarenalen Infiltraten	17
3.5. Intrarenale Th1-Typ Chemokin Expression.....	19
3.6. Kompartiment-spezifische Chemokin mRNA-Expression.....	21
3.7. Laser Microdissection des renalen Gewebes.....	23
3.8. Quantifizierung der renalen Schäden.....	25
3.9. Fibrose-Marker.....	25
3.10. Matrixmetalloproteinasen (MMPs).....	27
3.11. Die renale Funktion.....	29

4. Diskussion.....	30
5. Zusammenfassung.....	33
6. Literaturverzeichnis.....	34
7. Danksagung.....	37
8. Lebenslauf (enfällt).....	38
9. Eidesstattliche Versicherung.....	38

Angenommen von der Medizinischen Fakultät
der Universität Hamburg am: 14.04.2009

Veröffentlicht mit der Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität Hamburg am:

Prüfungsausschuss, Vorsitzender:	Prof. Dr. med. Ulrich Wenzel
Prüfungsausschuss, 1. Gutachter:	Prof. Dr. med. J. Kähler
Prüfungsausschuss, 2. Gutachter:	Prof. Dr. med. R. Böger

X. Abstrakt

Die vorliegende Studie untersuchte die Pathogenese der interstitiellen Inflammation und Fibrose in antihypertensiv behandelten Ratten. Ratten mit 2 Nieren, 1 Klipp Goldblatt Hypertonie wurden in vier Gruppen randomisiert: keine Behandlung, moderate, intermediäre und intensivierte Blutdrucksenkung mit ansteigenden Dosierungen des Vasopeptidase-Hemmers AVE 7688 für 6 Wochen. Der Vasopeptidase-Hemmer senkte den Blutdruck dosisabhängig. Der tubulointerstitielle Schaden war von einer diffusen Infiltration von mononukleären Zellen und umschriebenen mononukleären inflammatorischen Zell-Cluster-Formationen begleitet. Die Zell-Cluster bestanden hauptsächlich aus T-Zellen und zu einem kleineren Anteil aus Makrophagen und B-Zellen. Real-time PCR Analysen zeigten eine dosisabhängige Induktion von MCP-1 und der Th1-Typ Chemokine IP10 und Mig, sowie ihren korrespondierenden Rezeptor CXCR3 und dem Th1-Cytokin IFN- γ . In situ Hybridisierung und Laser Microdissection zeigten eine starke Expression dieser Th1-assoziierten Transkripte in den Clustern, wobei MCP-1 auch zusätzlich diffus im Interstitium nachgewiesen werden konnte. Die Inflammation war begleitet durch das Vorkommen von Myofibroblasten und Synthese des Fibrosefaktors Plasminogen Aktivator Inhibitor-1 (PAI-1), sowie der Kollagenase Matrixmetalloproteinase-2 (MMP-2). Darüber hinaus fand sich dosisabhängig eine Hochregulation von Kollagen I und eine interstitielle Vernarbung. Es zeigte sich keine Inflammation oder Fibrose bei normotensiven Ratten, die den Vasopeptidase-Hemmer erhielten. Diese Ergebnisse gewähren neue Einblicke in die molekularen Mechanismen der T-Zell vermittelten Immunantwort und Monozyten-Rekrutierung in der stenosierten Niere unter antihypertensiver Therapie und legen nahe, dass die Th1-Chemokine IP10 und Mig, sowie ihr Rezeptor CXCR3 mögliche Ansätze für die therapeutische Intervention bei ischämischer Nephropathie sein könnten.

1. Einleitung

1.1. Chronische progressive Nierenerkrankungen

Chronische progressive Nierenerkrankungen stellen eine große Herausforderung mit steigender Anzahl von Patienten dar, die das Stadium der finalen Nierenerkrankung erreichen. Die Blockade des Renin-Angiotensin-Systems (RAS) hat einen positiven Einfluss auf chronische Nierenerkrankungen und gilt dabei als eine fest etablierte Therapie (25, 29). Im Gegensatz dazu kann die Blockade des RAS bei Nierenarterienstenose schädliche Wirkungen auf die stenosierte Niere haben und Nierenversagen induzieren. Während eine Nierenarterienstenose relativ einfach mit Standard Untersuchungsmethoden diagnostiziert werden kann, stellt die Stenose der kleinen intrarenalen Gefäße bei Nephrosklerose eine weit aus größere diagnostische und therapeutische Herausforderung dar (23). Anhaltende Hemmung des Angiotensin-I-Konversionsenzym (ACE) bei renovaskulärer Hypertonie induziert schweren Schäden in der geklippten Niere, wie von uns und anderen bereits beschrieben wurde (10, 27, 28). Dennoch ist bislang über die zu Grunde liegenden Mechanismen und Mediatoren dieser Schädigung wenig bekannt. Die Rekrutierung von inflammatorischen Zellen in das renale Gewebe ist ein typisches Merkmal vieler verschiedener Nierenerkrankungen, wie Glomerulonephritiden und Vaskulitiden. Während T-Zellen fast sicher eine wichtige Rolle in der progressiven Schädigung bei chronischen tubulointerstitiellen Erkrankungen einnehmen, wurde bislang nicht genau bestimmt, welche Faktoren der Rekrutierung und Aktivierung von T-Zellen zu Grunde liegen. Deshalb haben wir in dieser Studie die Effekte der Blutdrucksenkung auf die Kompartiment-spezifische inflammatorische und fibrotische Antwort in der geklippten Niere von Ratten mit Goldblatt-Hypertonie untersucht.

1.2. Angiotensin-Konversionsenzym-Hemmer (ACE-Hemmer)

Der Einsatz der ACE-Hemmer ist eine fest etablierte Therapie zur Behandlung der arteriellen Hypertonie und der Herzinsuffizienz. ACE-Hemmer verlangsamen die Progression chronischer Nierenerkrankungen und wirken daher nephroprotektiv (25, 28).

1.3. Die Neutrale Endopeptidase

Die Neutrale Endopeptidase ist ein Membran-gebundenes Ektoenzym, welches in den Endothelzellen und glatten Muskelzellen der Gefäße, kardialen Myozyten und im Bürstensaum renaler Tubuluszellen hohe Aktivität aufweist. Es ist für den Abbau mehrerer vasodilatierender Peptidhormone, wie das Atriale Natriuretische Peptid (ANP), Brain natriuretische Peptid (BNP) und

C-Typ Natriuretische Peptid (CNP), verantwortlich. Die Natriuretischen Peptide entfalten ihre vasodilatierende Wirkung durch eine direkte Aktivierung der Guanylatzyklase in den glatten Muskelzellen. Sie verfügen auch über weitere Wirkmechanismen, wie die Erhöhung der Salz- und Wasserausscheidung, Senkung der zentralen Sympathikusaktivität sowie die Hemmung der Renin- und Aldosteronsekretion.

1.4. Vasopeptidase-Hemmer

Die Vasopeptidase-Hemmer sind eine neue Medikamentenklasse, die gleichzeitig das ACE und die Neutrale Endopeptidase hemmen. Da natriuretische Peptide durch die neutrale Endopeptidase abgebaut werden, führt die Behandlung mit Vasopeptidase-Hemmern nicht nur zu einer reduzierten Produktion des Vasokonstriktors Angiotensin II, sondern auch zur Akkumulation der Vasodilatoren, was einen günstigen Effekt auf den Verlauf der Hypertonie mit sich bringt. Die vorhandenen klinischen Daten zeigen, dass bei Patienten mit Hypertonie und Linksherzinsuffizienz eine Behandlung mit dem Vasopeptidase-Hemmer Omapatrilat gegenüber einer Behandlung mit ACE-Hemmer hämodynamische Vorteile besitzt (20, 24). Die klinische Einführung scheiterte jedoch an dem ungünstigen Nebenwirkungsprofil von Omapatrilat.

1.5. Angiotensin-Konversionsenzym-Hemmer (ACE-Hemmer) und Nierenarterienstenose

Anhaltende ACE-Hemmer Therapie induziert eine schwere tubulointerstitielle Schädigung in der geklippten Niere bei renovaskulärer Hypertonie, da Funktion und Struktur der geklippten Niere Angiotensin-II-abhängig sind (10, 27).

1.6. Die Th1- und Th2-induzierte Immunantwort

Bei den T-Lymphozyten gibt unter anderem T-Helfer-Zellen vom Typ 1 (Th1) und Typ 2 (Th2), die sich im Muster ihrer produzierten Zytokine und Chemokine unterscheiden. Die Th1-Lymphozyten sind bei der zellvermittelten Immunabwehr beteiligt, indem sie Zytokine (wie IFN- γ) und Chemokine (wie IP-10 und Mig) produzieren, die andere T-Zellen oder Makrophagen aktivieren können. Die Th2-Zellen hingegen sind eher an der humoralen Immunabwehr beteiligt und können durch ihre Zytokine (wie IL-4 und IL-10) einen Antikörperklassenwechsel bewirken und Eosinophile Granulozyten stimulieren. Welche der beiden Immunantworten überwiegend aktiviert wird, hängt hauptsächlich von der auslösenden Noxe ab.

1.7. Ziel

Ziel dieser Studie war es die Pathogenese der interstitiellen Inflammation und Fibrose in der stenosierten Niere bei zunehmender Blutdrucksenkung durch den Vasopeptidase-Hemmer AVE 7688 bei Ratten im 2 Nieren, 1 Klipp Goldblatt-Hypertonie-Modell zu untersuchen.

2. Methoden

2.1. Tierkollektiv, Tierhaltung, Ernährung

Diese Studie wurde mit 71 Sprague-Dawley Ratten (Charles River, Kisslegg, Deutschland) durchgeführt. Die Tiere hatten einen freien Zugang zum Wasser und zum Futter. Die drei Gruppen, die keine medikamentöse Behandlungen erhielten, hatten ein Standardfutter (Firma ssniff, Soest, Deutschland). Die vier behandelten Tiergruppen erhielten ein Futter, welchem das AVE 7688 jeweils in drei verschiedenen Dosierungen zugesetzt war (Firma Sanofi-Aventis). Die individuelle Kennzeichnung der Tiere erfolgte durch eine Markierung am Schwanz. Die Experimente wurden gemäß der Richtlinien für experimentelle Tierversuche der American Physiological Society durchgeführt. Ein Tierversuchsantrag war vor Durchführung der Versuche von der zuständigen Behörde in Hamburg genehmigt worden. Eine detaillierte Analyse der Anzahl und der Schicksale der Tiere, die in dieser Studie untersucht wurden, ist unter „2.3. Blutdruckmessung“ und „3.1. Generelle Charakteristika“ angegeben. Es wurde der Ansatz von Hampshire angewendet, um ungenügend beschriebene Tierversuche zu verhindern (9).

2.2. Die Klipp-Operation

Die 2 Nieren, 1 Klipp Hypertonie wurde bei allen Tieren, die zur OP-Zeit 120-140 g wogen, durch Aufschieben eines Klipps (U-förmige Silberklammer, innerer Durchmesser 0.23-0.25 mm) auf die rechten Nierenarterie nach Freipräparation erzeugt. Die kontralaterale linke Niere blieb unberührt. Der Eingriff erfolgte über einen Flankenschnitt auf einem beheizten Operationstisch in Isofluran-Narkose (27, 28). In der Gruppe der scheinoperierten Tiere wurde die Operation genauso durchgeführt, jedoch ohne Aufsetzen der Klammer auf die Nierenarterie. Die Muskulatur wurde wieder vernäht und die Haut mit Wundklammern verschlossen.

2.3. Blutdruckmessung

Der systolische Blutdruck wurde an wachen Tieren mit der Schwanzplethysmographie gemessen. In beheizbaren Röhren wird die Körpertemperatur der Ratten um 0.3-0.5 °C erhöht. Die Schwanzarterie, mit der die Ratte ihren Wärmehaushalt regulieren kann, wird dabei dilatiert, und ihre Pulsationen können mit einer halbautomatischen Einheit aufgenommen, elektronisch verstärkt und optisch sichtbar gemacht werden (TSE-Systems, Bad Homburg, Deutschland). Gemäß des Rivarocci-Prinzips wird die Schwanzarterie an der Schwanzwurzel mit einer Druckmanschette mittels

eines Gauger-Druckmanometers über den systolischen Druck hinaus okkludiert. Beim Ablassen des Drucks aus der Manschette werden die ersten regelmäßigen pulssynchronen Aktivitäten, die optisch wahrgenommen werden, als systolischer Blutdruck abgelesen.

Nur Ratten, die 6 Wochen nach der Klipp-Operation, einen systolischen Blutdruck >160 mmHg entwickelt hatten, wurden ins Protokoll aufgenommen. 47 von 99 geklippten Ratten haben keine Hypertonie entwickelt (47,5%). Diese Tiere wurden eingeschläfert.

2.4. Tiergruppen

Es wurden zunächst 5 Tiergruppen untersucht:

- Kontrollen Normotensive Kontrolltiere (n=12)
- Goldblatt 2 Nieren, 1 Klipp hypertensive Tiere (n=12)
- Moderate 2 Nieren, 1 Klipp hypertensive Tiere
Blutdrucksenkung + AVE 50 (50 mg/kg) (n=10)
- Intermediäre 2 Nieren, 1 Klipp hypertensive Tiere
Blutdrucksenkung + AVE 150 (150 mg/kg) (n=11)
- Intensivierte 2 Nieren, 1 Klipp hypertensive Tiere
Blutdrucksenkung + AVE 450 (450 mg/kg) (n=9)

In einem zweiten Durchgang wurde der Effekt von AVE 7688 bei normotensiven Tieren untersucht. Hierfür wurden zwei weitere Gruppen hinzugefügt:

- Kontrollen Normotensive Kontrolltiere (n=6)
- Kontrollen mit Normotensive Kontrolltiere (n=6)
antihypertensiver + AVE 450 (450 mg/kg)
Behandlung

2.5. Urinanalyse

Zur Urinanalyse wurden die Tiere in Stoffwechsellkäfige gehalten. Der 24-Stunden-Urin wurde zur Bestimmung des Kreatinins gesammelt. In dieser Zeit hatten die Tiere einen freien Zugang zum Wasser, erhielten aber kein Futter.

2.6. Die renale Funktion

Um die Gesamtnierenfunktion zu untersuchen, wurde die Kreatininclearance aus dem 24-Stunden Urin und dem Plasmakreatinin bestimmt. Plasma- und Urinkreatinin wurden mit einem Autoanalyzer (Hitachi 717; Roche, Mannheim, Deutschland) gemessen.

2.7. Die Entfernung der Nieren

Am Ende des experimentellen Protokolls, nach 6 Wochen Therapie, wurde in Narkose zunächst Blut aus der Aorta entnommen. Anschließend wurde die stenosierte Niere in situ mit eiskalter Phosphat-gepufferter Kochsalzlösung perfundiert, bis die Nieren vollständig verblasst waren. Dann erst wurden die Nieren entnommen, gewogen und als Schnitte im 4% gepufferten Formalin für Histologie bzw. auf Trockeneis mit Tissue Tek für In situ Hybridisierung und Laser Microdissection vorbereitet (18).

2.8. Die Präparation von Total-RNA und Real-time RT-PCR

Total-RNA wurde vom Nierencortex der geklippten Niere isoliert mit Phenol-Chloroform-Extraktion nach direkter Lyse der Glomeruli in 4 M Guanidinium-Thiocyanate, 25 mM Natrium-Citrat, pH 7, 0.5% Sacrosyl, 0.1 M2-Mercaptoethanol, wie im Labor etabliert (18). RNA von microdisseziertem Gewebe wurde isoliert durch RNA Nano Prep Kit (PALM, Bernried, Deutschland) (18). Real time RT-PCR wurde mit AbiPrism NN8650, unter Einsatz von SYBR green als Farbstoff, durchgeführt (18). Die Quantifizierung erfolgte mit GAPDH als seine interne Kontrolle für die Korrektur kleiner Variationen in RNA-Menge und cDNA-Synthese, wie von AbiPrism beschrieben.

Die präsentierten Ergebnisse sind Mittelwerte 4 unabhängig durchgeführter RT-PCRs, die mit verschiedenen RNAs, je gepoolt von 2-4 Ratten, erfolgt sind.

Die im Folgenden dargestellte rattenspezifische PCR-Primer wurden in dieser Studie eingesetzt:

Primer	forward	reverse
MCP-1	Fw 5'CTG TCT CAG CCA GAT GCA GTT AA 3'	Rev 5'TGG GAT CAT CTT GCC AGT GA 3'
IP10	Fw 5'GGG CCA TAG GAA AAC TTG AAA TC 3'	Rev 5'CAT TGT GGC AAT GAT CTC AAC AT 3'
Mig	Fw 5'AAT CCC TCA AAG ACC TCA AAC AGT 3'	Rev 5'GCA GGT TTG ATC TCC GTT CTT C 3'
CXCR3	Fw 5'TCG GCT CTG GTC TCT GCA A 3'	Rev 5'GCT TAT ACA GGC CAG CAG GAA 3'
ICAM-1	Fw 5'TTG GAG GTG GAT GGG AAG TC3'	Rev 5'GTT CCC CAA GCA GTC CTT CTT3'
osteopontin	Fw 5'CGA TGA GGC TCT CAA GGT CAT C3'	Rev 5'CCC GTT GCT GTC CTG ATC A3'
IFN gamma	Fw 5'GCC AAG TTC GAG GTG AAC AAC 3'	Rev 5'TAG ATT CTG GTG ACA GCT GGT GAA 3'
PAI-1	Fw 5'CAA GTC TGA TGG TAG CAC CAT CTC 3'	Rev 5'CCG GAG TGG TGA ACT CAG TGT 3'
Collagen a1 I	Fw 5' CCG GCT CCT GCT CCT CTT A 3'	Rev 5' AGG GAC CCT TAG GCC ATT GT 3'
MMP-2	Fw 5'CCC ATG AAG CCT TGT TTA CCA 3'	Rev 5'TGG AAG CGG AAC GGA ACT 3'

2.9. In situ Hybridisierung

Der in situ Hybridisierungs-Vorgang wurde, wie im Labor etabliert, durchgeführt (18,22). Die eingesetzten Sonden für Ratten-IP10, -Mig, -MCP-1 und PAI-1 wurden durch in vitro Transkription vom subklonierten cDNA hergestellt. Die IP10-Sonde korrespondierte mit den Nukleotiden 125-431 der Sequenz NM_139089, die Mig- Sonde mit den Nukleotiden 74-428 der Sequenz BC087594, die MCP-1- Sonde mit den Nukleotiden 278-631 der Sequenz M57441 und die PAI-1-Sonde mit den Nukleotiden 1121-1384 der Sequenz M24067. Antisense- und Sense-RNA-Transkripte wurden mit ^{35}S -UTP (20 $\mu\text{Ci/ml}$; Amersham, Buckinghamshire, England) markiert und dienten entsprechend als Hybridisierung-Sonde und Kontrolle. Freie Nukleotide wurden mit einer Sephadex G-50 Säule (quick-spin column, Roche, Grenzach-Wyhlen, Deutschland) separiert. In situ Hybridisierung wurde mit 12 μm Cryoschnitten vom renalen Gewebe durchgeführt, jeweils mit 5ng des ^{35}S -markiertem antisense und sense RNA-Sonden. Die Schnitte wurden über Nacht Kodak Biomax MR Röntgenfilm aufgesetzt. Anschließend wurden sie mit Kodak NTB-3 Nuclear track Emulsion behandelt und drei Wochen lang belichtet, danach in Kodak D19 entwickelt und mit Kodak-Unifix fixiert. Dann wurden die Schnitte mit Mayer's Hemalaun gefärbt.

2.10. Tissue Laser Microdissection

Die Microdissection wurde anhand 8 μm dicker Cryoschnitte vom renalen Gewebe, mittels PALM MicroBeam IP230V Z Mikroskop für Laser Pressure Catapulting (PALM), wie im Labor etabliert (18), durchgeführt. Dem Dissectionsprozess vorausgehend, wurden die Schnitte mit einem kurzen alkoholbasierten Cresyl Violet Acetate Protokoll gefärbt: Die Cryoschnitte wurden eine Minute luftgetrocknet, und nachfolgend 2 Minuten in vorgekühltem Ethanol inkubiert. Für die Färbung wurden die Schnitte 20 Sekunden lang in 1% Cresyl Violet Acetat, gelöst in Alkohol, getaucht. Schließlich wurden die Schnitte 30 Sekunden in 75 und 100% Alkohol gewaschen und für 10 Minuten luftgetrocknet. Zwei verschiedene Gewebetypen wurden selektiv ausgeschnitten: 1) Areale mit inflammatorischen Zell-Clustern 2) Regionen derselben Niere ohne inflammatorische Zell-Cluster. RNA von microdisseziertem Gewebe wurde mittels PALM RNA Extraction Kit, laut Herstellerprotokoll, präpariert.

2.11. Histologie

Für die Histochemie wurden 4% Formalin-fixierte Nierenscheiben Paraffin-gebettet, als 1-3 μm dicke Schnitte abgetragen und PAS-gefärbt (PAS, Sigma, Ulrichstein, Deutschland). Das tubulointerstitielle Volumen wurde durch Überlagerung eines 40 Punkte Gitters auf lichtmikroskopische Bildern

bestimmt. Die Anzahl der über Tubuluszellen und Interstitium liegenden Punkte wurde gezählt und als Prozentsatz aller Probepunkte berechnet (12). Für die Immunhistochemie wurden 1-3 µm Paraffinschnitte deparaffinisiert und rehydriert. Die Färbung fand nach Antigen-Aufbereitung mit Protease-24 (15 min, 5mg/1 ml; Sigma, Ulrichstein, Deutschland) oder mittels Mikrowellen-Behandlung mit Tris-basierter Kochsalzlösung Tween-EDTA, pH 9.0, oder Citrat-Puffer, pH 6.1, für 25 Minuten, statt. Nach dem Blocken der unspezifischen Bindungsstellen mit 5% Pferde- oder Ziegenserum (VECTOR, Ebersberg, Deutschland) für 30 Minuten bei Raumtemperatur, wurden die Schnitte entweder mit einem Antikörper direkt gegen den Monozyten-spezifischen Marker ED-1 (1:300, 1.5 Stunden bei Raumtemperatur; Serotec, Martinsried, Deutschland) für die Evaluation der renalen M/M-Infiltration, mit einem Antikörper gegen den T-Zell-Marker CD3 (1:400, über Nacht bei 4°C, clone IF4; Biozol, Eching, Deutschland), mit einem anti-proliferativen Zell nukleären Antigen Antikörper (1:200, über Nacht bei 4°C, Ab-1; Calbiochem, San Diego, CA, USA) oder einem B-Zell-spezifischem Antikörper gegen CD79 (1:600, 1 Stunde bei Raumtemperatur, clone HM57; Dakopatts, Kopenhagen, Dänemark) gefärbt. Sekundäre Antikörper (biotinylated affinity-purified Esel IgG) wurden 30 Minuten, bei Raumtemperatur, bei einer 1:400 Verdünnung (alle sekundären Antikörper wurden von den Jackson Immunoresearch Laboratories, West Grove, PA, USA erworben), inkubiert. Die Signalverstärkung wurde mittels dem ABC-AP Kit von VECTOR (s.o.), entsprechend der Anleitung des Herstellers, durchgeführt. Die Farbentwicklung wurde mit Neufuchsin als Substrat durchgeführt. Die Nuklei wurden mit Mayer's Hemalaun 1 Minute lang gegengefärbt und mit HCl-Ethanol differenziert. Die α -Smooth Muscle Cell Actin Färbung wurde in der Pathologie in Groningen, Holland, durchgeführt (8).

2.12. Matrixmetalloproteinasen (MMPs)

Das Gelatin-Zymogramm von Matrixmetalloproteinasen (MMPs) wurde, wie im Labor etabliert, durchgeführt (30). Renales Kortextgewebe wurde in einem Dissoziationspuffer homogenisiert (1) und über Nacht bei 4°C geschüttelt. Der Überstand wurde für die zymographische Analyse benutzt. Gleiche Proteinmengen wurde auf das Gel geladen. Die Intensität der lytischen Banden wurden durch einen Bio-Rad Gel-Scanner (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) gelesen. MMP-2 wurde durch Größe und Positivkontrollen identifiziert.

2.13. Statistische Analyse

Die Resultate wurden als Mittelwert \pm SEM dargestellt. Die statistische Signifikanz war definiert als $p < 0.05$. Für multiple Vergleiche haben wir den Kruskal Wallis Test mit Post hoc Scheffe' Analyse, laut Mann-Whitney-U, eingesetzt. Die P-Werte sind für die multiplen Vergleiche korrigiert.

3. Ergebnisse

3.1. Generelle Charakteristika

Nach Randomisierung überlebten in der Gruppe der hypertensiven Ratten ohne Therapie (Goldblatt) 12 von 16 Tieren (75%) und in der Gruppe mit der intensivierten Blutdrucksenkung 9 von 10 Tieren (90%). In allen anderen Gruppen überlebten 100% der Tiere das Experiment.

Bei den hypertensiven Ratten kam es zur Atrophie der geklippten Niere. Die antihypertensive Therapie verringerte zusätzlich das Gewicht der geklippten Niere. Diese Charakteristika sind in Tab.1 dargestellt.

Tab.1: Tiergewicht, Überlebensrate, Körpergewicht und relatives Gewicht der geklippten Niere

	n	Überlebensrate (%)	Körpergewicht (g)	Relatives Gewicht geklippte Niere (g/100g)
Kontrollen	12	75%	526±23	0.38±0.02
Goldblatt	12	100%	499±17	0.33±0.02#
Moderate Blutdrucksenkung	10	100%	503±19	0.31±0.02
Intermediäre Blutdrucksenkung	11	100%	463±17	0.29±0.02
intensified Blutdrucksenkung	9	90%	437±14*	0.24±0.04

#=p<0.0125 vs. Kontrollen, *=p<0.0125 versus Goldblatt

3.2. Blutdruck

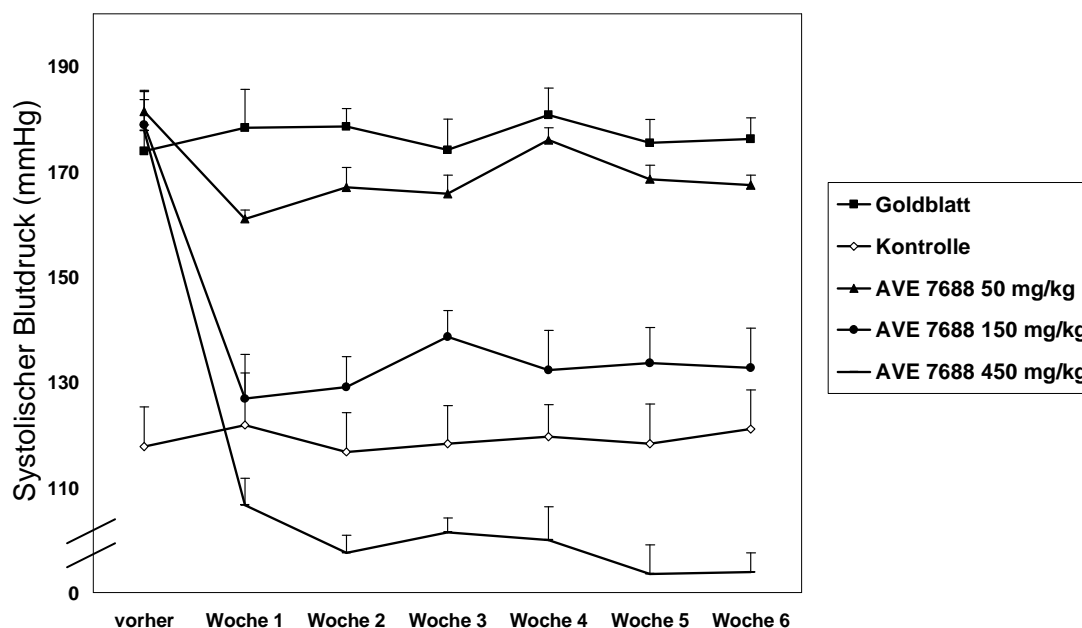


Abb. 1: Systolischer Blutdruck

Der systolische Blutdruck wurde, wie in Abb. 1 dargestellt, während der Behandlungszeit von 6 Wochen mit AVE 7688, dosisabhängig wie folgt gesenkt: eine moderate Blutdrucksenkung wurde mit AVE 50 (50 mg/kg) erreicht, eine intermediäre mit AVE 150 (150 mg/kg) und eine intensivierete Blutdrucksenkung, unter normotensives Niveau, mit AVE 450 (450 mg/kg). Die Blutdruckwerte bei der Behandlung mit AVE 50 unterschieden sich nicht signifikant von den Werten der unbehandelten hypertensiven Ratten (Goldblatt-Gruppe). Die Blutdruckwerte der AVE 150- und AVE 450-Gruppe waren signifikant niedriger, im Vergleich zu der unbehandelten hypertensiven Gruppe (Goldblatt-Gruppe), während die Blutdruckwerte der Goldblatt-Gruppe gegenüber der Kontrollen signifikant höher waren. Der mittlere systolische Blutdruck der 7 Messungen vor bzw. während der Behandlungszeit von 6 Wochen ist in Tab. 2 dargestellt.

Tab. 2: Systolischer Blutdruck

Gruppe	Kontrollen	Goldblatt	Moderate Blutdruck-senkung	Intermediäre Blutdruck-senkung	Intensivierte Blutdruck-senkung
Systolischer Blutdruck (mmHg)	121±2	176±4#	168±8	133±7*	94±4*

#= p<0.001 vs. Kontrollen, *= p<0.001vs. Goldblatt

Die Behandlung normotensiver Ratten mit 450 mg/kg AVE, in dem oben beschriebenen zweiten Durchgang des Experiments, senkte den Blutdruck signifikant im Vergleich zu normotensiven Kontrolltieren (85 ± 4 vs. 118 ± 3 , $p < 0.05$).

3.3. Renale morphologische Veränderungen

PAS-gefärbte Nierenschnitte der geklippten Nieren sind in Abb. 2 dargestellt. Es zeigten sich keine tubulointerstitiellen Auffälligkeiten bei den normotensiven Kontrollen (Abb. 2A). Eine mäßige Zunahme des interstitiellen Volumens mit gelegentlich fokalen tubulären Schäden, konnten in den Nieren der unbehandelten hypertensiven Ratten (Goldblatt-Gruppe) verzeichnet werden (Abb. 2B). Im Gegensatz dazu wurden massive interstitielle Erweiterung und schwere tubuläre Atrophie und Dilatation in der geklippten Niere der behandelten Tiere vorgefunden. Diese Auffälligkeiten verschlechterten sich einhergehend mit der Intensivierung der Blutdrucksenkung (Abb. 2C-E).

Zusätzlich zu einer diffusen interstitiellen Infiltration durch mononukleäre Zellen, wurden dichte inflammatorische Zell-Cluster (Zellansammlungen) in der geklippten Niere bei den durch Vasopeptidase-Hemmer behandelten Ratten gefunden (Abb. 2F). Die Glomeruli stellten sich in allen Tiergruppen unauffällig dar. Durch die Behandlung normotensiver Ratten mit AVE 450 (450 mg/kg) wurden keine renalen Schäden verursacht (Abb. 2H), verglichen mit unbehandelte normotensive Kontrollen (Abb. 2G).

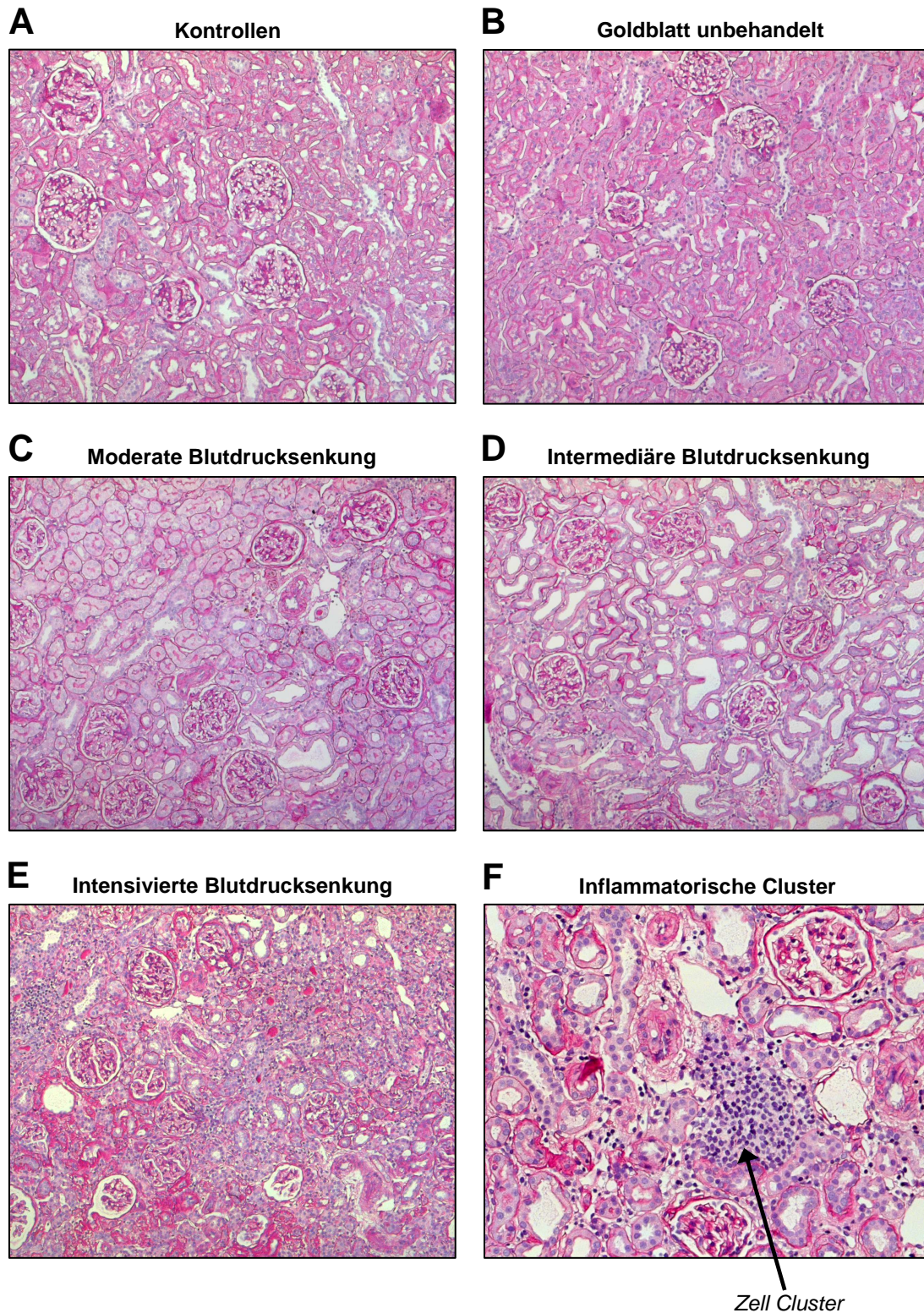


Abb. 2 A-F: Lichtmikroskopische Bilder der histologischen Veränderungen der geklippten Nieren. Die Tubuli sind in Kontrollen gut erhalten (A). Mäßige tubulointerstitielle Schäden zeigten sich in den geklippten Nieren der Goldblatt-Gruppe (B). Tubulointerstitielle Schäden sind mit moderater (C), intermediärer (E) und intensivierte (F) Blutdrucksenkung dramatisch angestiegen. Dichte inflammatorische Zell-Cluster wurden bei Ratten unter blutdrucksender Therapie gefunden. Vergrößerung: x100 (A-E) und x200 (F).

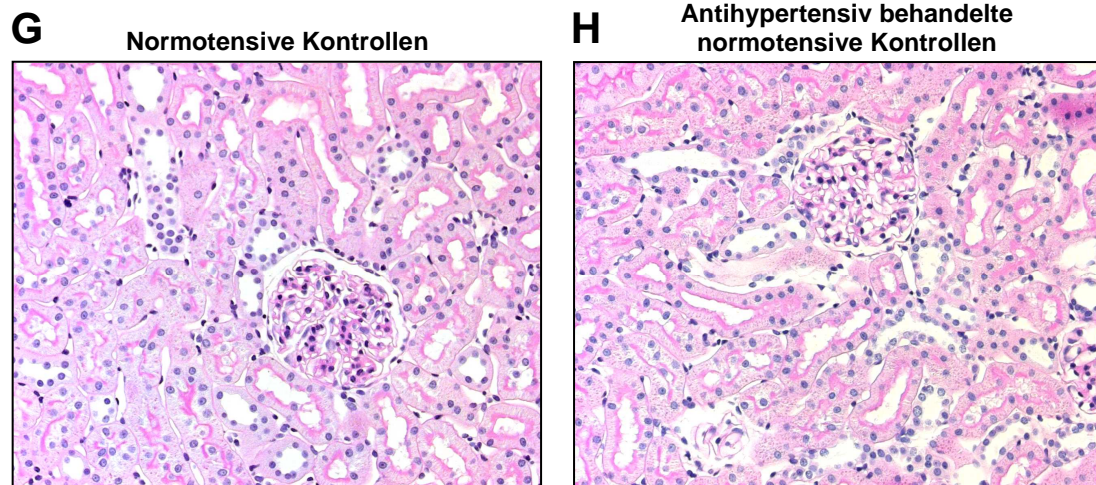


Abb. 2 G-H: Die Behandlung der normotensiven Ratten mit 450 mg/kg des Vasopeptidase-Hemmers induzierte keine renalen Schäden (H), verglichen mit unbehandelten Kontrollen (G). Vergrößerung x 200 (G-H).

3.4. Immunhistochemische Charakteristika von intrarenalen Infiltraten

Die Immunhistochemie von Serienschnitten ließ CD-3-positive T-Zellen und ED-1 Monozyten/Makrophagen (M/M) in den Clustern identifizieren, wie in den Abb. 3A und B gezeigt. Nur wenige proliferierende Zellen wurden in den Clustern gefunden, diese Tatsache lässt eher eine Infiltration der Zellen als eine lokale Proliferation in der Niere vermuten (Abb. 3C). Außerdem enthielten die Cluster B-Zellen (Abb. 3D). Die inflammatorischen Zell-Cluster konnten in relevanter Anzahl fast nur in den Nieren der Tiere mit intensiver Blutdrucksenkung gefunden werden, wie in der Abb. 3E zu sehen. Die diffusen Infiltrate bestanden fast ausschließlich aus ED-1-positiven M/M und einigen CD-3-positiven T-Zellen. Die Auszählung der intrarenalen Leukozyten offenbarte eine dosisabhängige Infiltration durch ED-1-positive M/M, wie in Abb. 3F dargestellt. Es wurde keine relevante glomeruläre Infiltration durch Immunzellen festgestellt. Diese strenge dosisabhängige Korrelation legt eine funktionelle Rolle der Blutdrucksenkung für die Infiltration von inflammatorischen Zellen in die stenosierte Niere hinein, wie auch für die Cluster-Formation, nahe.

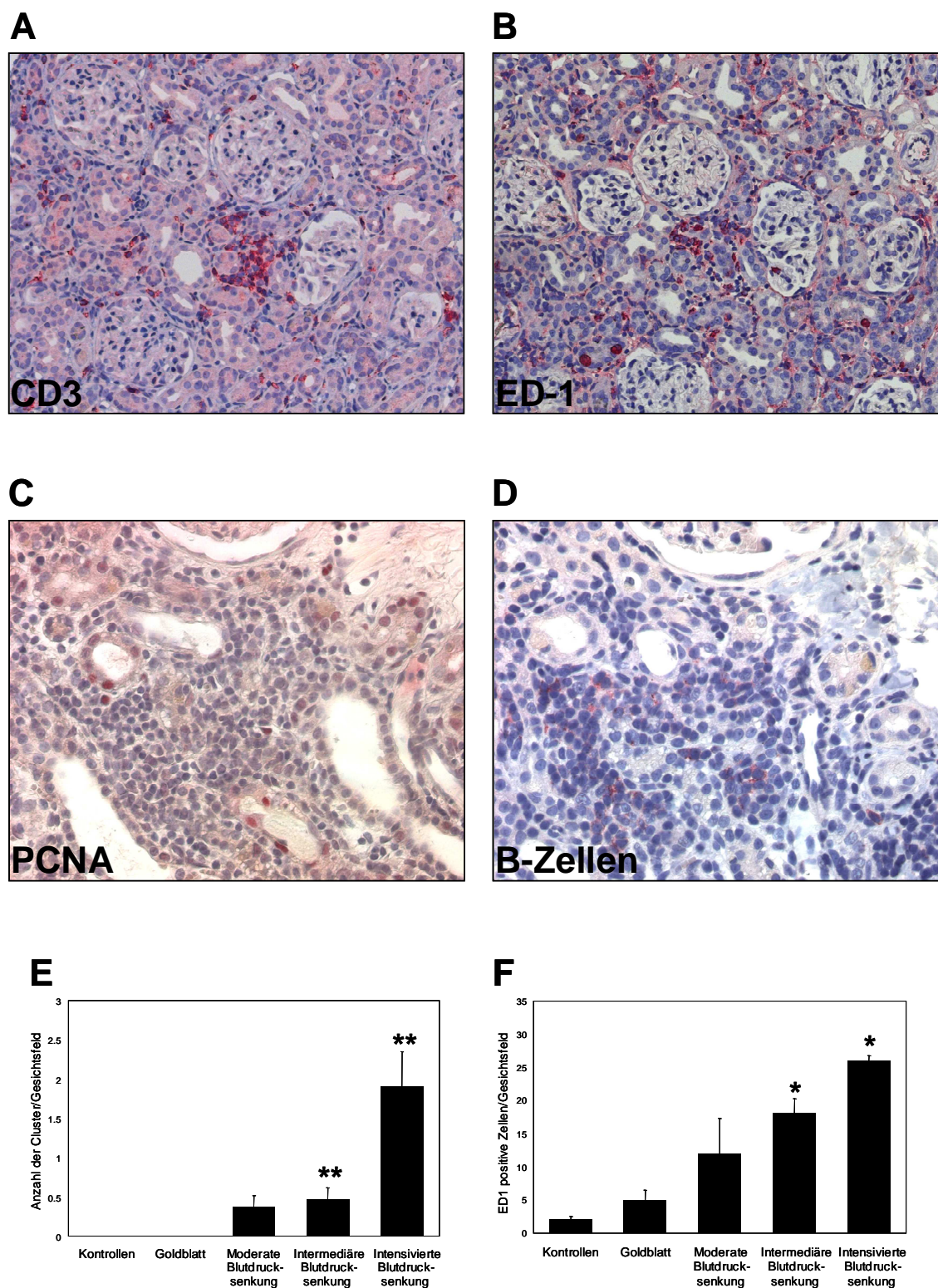


Abb. 3: Immunhistochemische Charakterisierung der intrarenalen Infiltrate. Es konnten hauptsächlich CD3-positive T-Zellen und ED1-positive Monozyten/Makrophagen (M/M) in den Clustern identifiziert werden (A und B). Nur wenige proliferative Zellen konnten in den Clustern gefunden werden (C). Einige der Cluster enthielten B-Zellen (D). Quantifizierung der Cluster (E) und der ED1-positiven Zellen (F) mittels Auszählung pro Gesichtsfeld zeigte eine steigende Anzahl einhergehend mit der Intensivierung der Blutdrucksenkung. *P < 0.05, **P < 0.001 vs. Goldblatt.

3.5. Intrarenale Th1-Typ Chemokin Expression

Angesichts der massiven Infiltration der Nieren durch T-Zellen und M/M bei den antihypertensiv behandelten Ratten, haben wir eine Real-time RT-PCR Analyse vom mRNA des gesamten Nierenkortexes der Tiere, durchgeführt, um herauszufinden, ob die Immunreaktion mit einer Th1-Antwort übereinstimmt. Im Kortex der antihypertensiv behandelten Tiere ließ sich ein Th1-phänotypisches Muster der Chemokine, manifestiert durch erhöhte mRNA-Expression der Th1-Chemokine IP10 (Abb. 4A) und Mig (Abb. 4B), als auch des Th1-Cytokins IFN- γ (Abb. 4C), demonstrieren. Darüber hinaus wurde das Chemokin MCP-1, erhöht um das 240fache, in den stenosierten Nieren der behandelten Ratten gefunden (Abb. 4D), während das Chemokin Regulated upon activation normal T expressed and secreted (RANTES) nur marginal exprimiert wurde. Sämtliche dieser Th1-assoziierten Moleküle waren dosisabhängig, korrelierend mit der Intensivierung der Blutdrucksenkung, hochreguliert (Abb. 4A-D). Zusätzlich ergaben PCR-Analysen eine erhöhte Expression des Oberflächen-Zelladhäsionsmoleküls Interzelluläres Adhäsionsmolekül-1 (ICAM-1) und des chemotaktischen Proteins Osteopontin in der geklippten Niere, welche wahrscheinlich an Adhäsion und nachfolgender Penetration von Leukozyten ins Gewebe hinein beteiligt sind. Allerdings war die dazugehörige Induktion nicht signifikant. Diese Daten ähneln früherer Darstellungen von Haller et al (6) und Gauer et al (7). Haller et al. detektierten ICAM-1 in der geklippten Niere mittels Immunhistochemie, und Gauer et al. fanden erhöhte Expression von Osteopontin, mittels Northern Blot Analyse, vor. Interessanterweise, ähnlich wie bei unserer Gruppe mit moderater Blutdrucksenkung, war auch in den oben genannten Studien die Expression von Osteopontin mit milder Blutdrucksenkung nicht hochreguliert, trotz der erhöhten Infiltration durch ED-1-positive Zellen. Real-time RT-PCR Analysen von mRNA aus dem Gesamtnierenkortex der antihypertensiv behandelten normotensiven Ratten, zeigten keinerlei Veränderungen in der Expression der Chemokine IP10, Mig und MCP-1, sowie von IFN- γ (behandelte versus unbehandelten Ratten: IP10 1.6fach, Mig 1.1fach, MCP-1 0.7fach, IFN- γ 1.2fach; PCR Analyse in doppelter Ausführung mit gepoolter RNA von jeweils 4 Tiere). Diese Tatsache weist darauf hin, dass die beobachteten Effekte keine toxischen oder unspezifischen Effekte des Vasopeptidase-Hemmers oder der Blutdrucksenkung, sind.

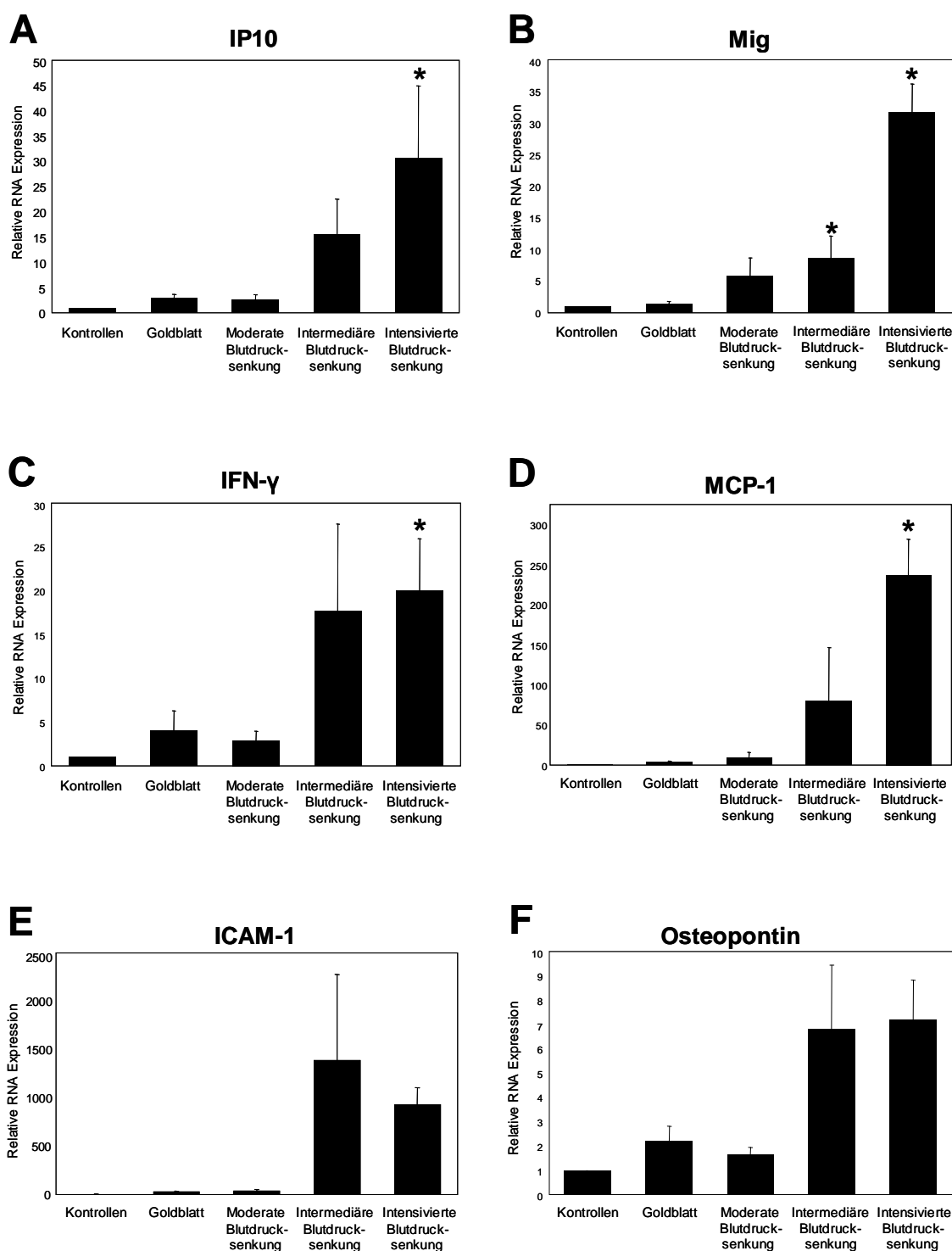


Abb. 4: Quantifizierung der intrarenalen Th1-Typ Chemokin Expression. RT-PCR Analysen der mRNA des Gesamtnierenkortexes demonstrieren ein Th1-phänotypisches Muster der Chemokine, manifestiert durch steigende mRNA Expression des Th1-Chemokins IP10 (A) und Mig (B), sowie des Th1-Prototyp-Cytokins IFN-γ (C). Zusätzlich war das Chemokin MCP-1 um das 240 fache in der geklippten Niere der antihypertensiv behandelten Ratten erhöht (D). Ebenso war eine streng dosisabhängige Induktion des Intrazellulären Adhensionsmoleküls-1 (ICAM-1) und Osteopontin (E bzw. F), zu beobachten. Statistische Signifikanz konnte jedoch nach Korrekturen für multiple Vergleiche nicht erreicht werden. *P < 0.05 vs. Goldblatt.

3.6. Kompartiment-spezifische Chemokin mRNA-Expression

Um die zelluläre Herkunft der mRNA Expression der hochregulierten Chemokine zu untersuchen, haben wir in situ Hybridisierungsstudien durchgeführt. Kontrollen und unbehandelte hypertensive Tiere (Goldblatt-Gruppe) zeigten fast keine Chemokin Expression. Eine starke Expression von IP10- und Mig-mRNA konnte fast ausschließlich in den inflammatorischen Zell-Clustern der intensiviert behandelten Tiere gefunden werden (Abb. 5A und B). Dieses Chemokin Expressionsmuster deckte sich mit dem Muster der infiltrierenden T-Zellen. Interessanterweise konnte die Expression des am meisten hochregulierten Chemokins, MCP-1, dahingegen in den Clustern (Abb. 5C), wie auch zusätzlich diffus (Abb. 5D) und tubulär (Abb. 5E) nachgewiesen werden. Die Infiltration von M/M wurde in den gleichen anatomischen Regionen detektiert, wie die MCP-1 mRNA Expression, nämlich fokal in den Clustern und verstreut im gesamten Kortex (siehe oben). Die Sense-Sonde zeigte nur ein Hintergrund-Signal (Daten nicht abgebildet).

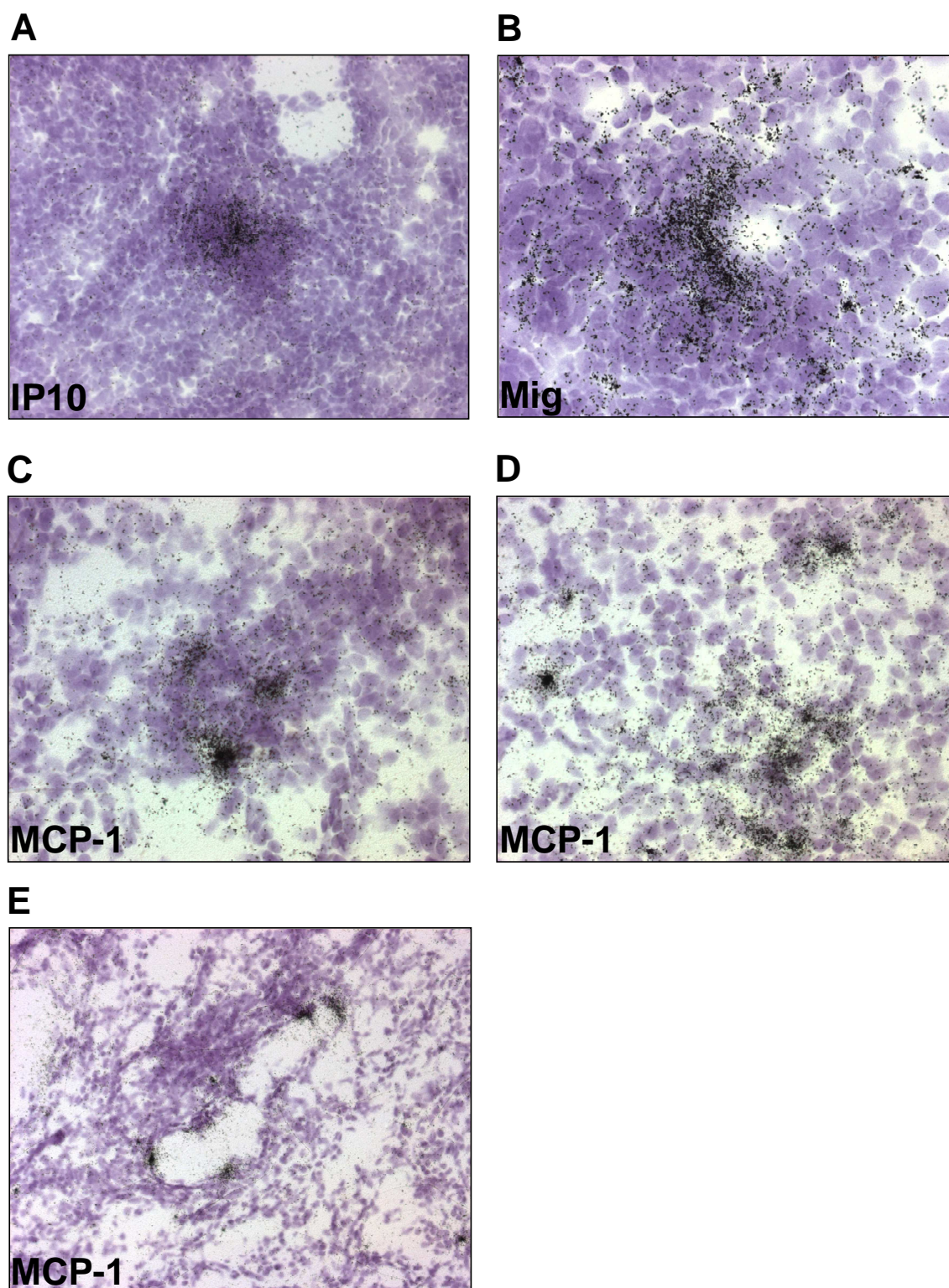


Abb. 5: Lokalisation der Chemokin mRNA Expression mittels In situ Hybridisierung. Die Expression von IP10 und Mig war fast ausschließlich in den inflammatorischen Zell-Clustern zu finden (A und B). MCP-1 konnte in Clustern (C), sowie diffus im Interstitium und in Tubuli gefunden werden (D bzw. E).

3.7. Laser Mikrodisektion des renalen Gewebes

Um das Cluster-spezifische Muster der IP10- und Mig-mRNA zu untersuchen, haben wir eine Laser Mikrodisektion der Zell-Cluster durchgeführt, wie in Abb. 6A und B gezeigt. Real-time RT-PCR Analysen der mRNA des mikrodisezierten Nierengewebes von Ratten mit intensivierter Blutdrucksenkung, zeigte eine starke Expression von IP10 (39.8fach) und Mig (53.8fach) und ihrem korrespondierenden Th1-Rezeptor CXCR3 (3.2fach), in den Clustern, verglichen mit interstitiellem Nicht-Cluster-Gewebe, das aus derselben Nierenscheibe gewonnen wurde (Abb. 6C). MCP-1 mRNA, obgleich exprimiert in beiden renalen Kompartimente, wurde deutlich höher angereichert in den Cluster vorgefunden (31.4fach gegenüber Nicht-Cluster-Gewebe). RANTES mRNA wurde allgemein nur leicht erhöht exprimiert nachgewiesen. Innerhalb der Cluster war die Expression etwas stärker, im Vergleich zu Nicht-Cluster-Gewebe (1.8fach). Somit unterstützten die Ergebnisse der Mikrodisektion mit anschließender quantitativer Real-time RT-PCR Analyse deutlich die Daten der In situ Hybridisierung.

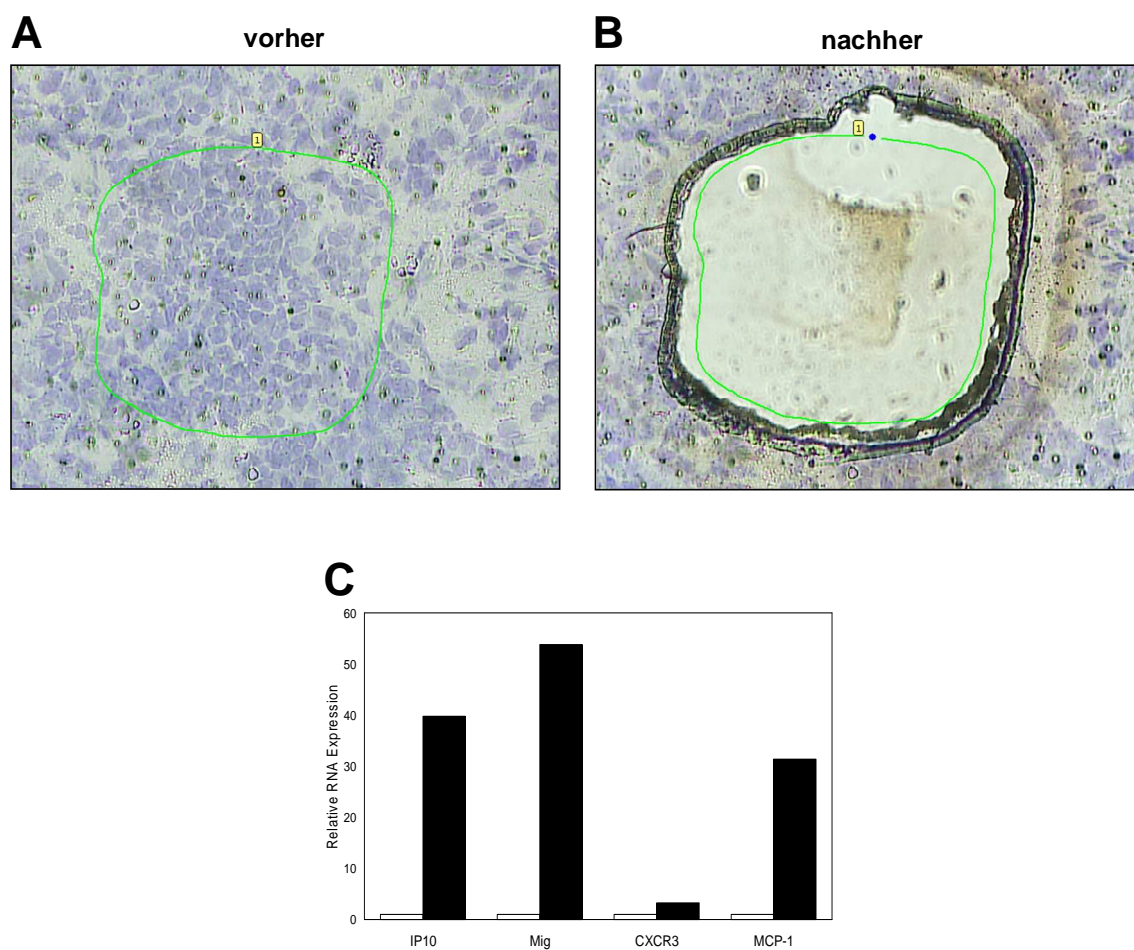


Abb. 6: Kompartiment-spezifische Chemokin mRNA Expression mittels Laser Mikrodissektion. *A und B:* Ein Zell-Cluster vor und nach dem Ausschneiden des Gewebes für PCR Analyse. Inflammatorische Zell-Cluster und interstitielle Regionen derselben Niere ohne Infiltrate wurden selektiv durch Laser Mikrodissektion ausgeschnitten. *C:* Real-time PCR der mRNA aus den Clustern zeigt eine erhebliche Hochregulation der Th1-Chemokine IP10 und Mig und ihrem korrespondierenden Rezeptor CXCR3, sowie MCP-1, ausschließlich im Cluster-Gewebe (*schwarze Säulen*), verglichen zum Nicht-Cluster-Gewebe (*weiße Säulen*). Gezeigt sind gemittelte Ergebnisse aus 3 Experimenten.

3.8. Quantifizierung der renalen Schäden

Myofibroblasten erscheinen innerhalb des Interstitiums und führen zu einer erhöhten Matrixsynthese. α -Smooth Muscle Cell Actin ist ein Marker interstitieller Fibroblasten. Die Färbung kann daher als Nachweis interstitieller Schäden benutzt werden.

Je progressiver die Blutdrucksenkung war, desto häufiger wurden α -Smooth Muscle Cell Actin-positive Areale in der geklippten Niere vorgefunden (Abb. 7A). Die Senkung des Blutdruckes erhöhte ebenfalls progressiv das interstitielle Volumen, ermittelt durch Punktezählung (Abb. 7B). Dies bestätigt den interstitiellen Schaden mit zwei unterschiedlichen methodischen Ansätzen.

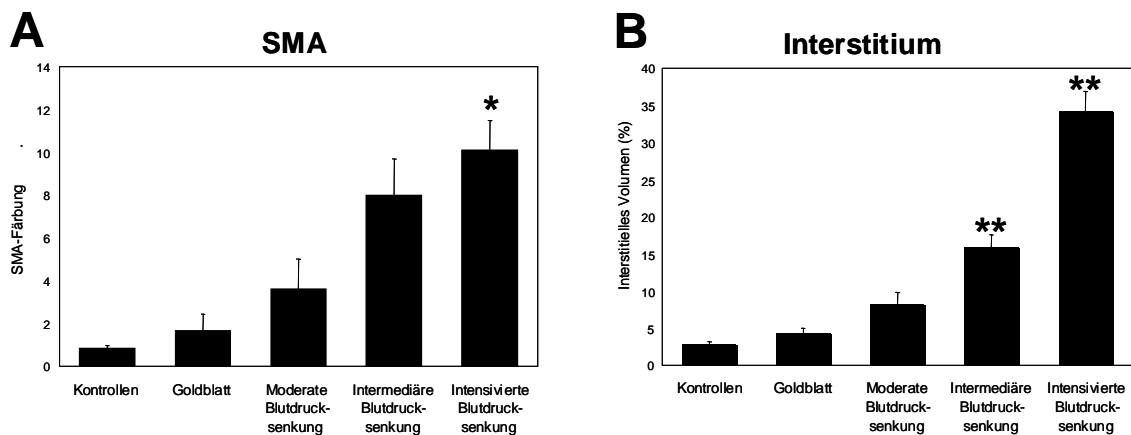


Abb. 7: Quantifizierung des renalen Schadens mittels Färbung für α -Smooth Muscle Cell Actin (SMA) (A) und Punktezählung des interstitiellen Areals (B). Die Akkumulation von Myofibroblasten und das interstitielle Volumen stiegen mit Intensivierung der Blutdrucksenkung in der geklippten Niere, im Vergleich zu unbehandelten Goldblatt-Ratten. *P < 0.05, **P < 0.001 vs. Goldblatt.

3.9. Fibrose-Marker

Um die Mechanismen der progressiven tubulointerstitiellen Schäden in der geklippten Niere zu evaluieren, haben wir die Expression des profibrotischen Faktors Plasminogen-Aktivator-Inhibitors-1 (PAI-1) gemessen. Die Blutdrucksenkung erhöhte die Expression von PAI-1 in der geklippten Niere (Abb. 8A). Um die Lokalisation von mRNA Expression zu analysieren, wurde eine in situ Hybridisierung für PAI-1 durchgeführt. Wie in der Autodiagrammübersicht (Abb. 8B), und im Detail in den Abb. 8C und D gezeigt, konnte PAI-1 Expression diffus im gesamten Kortex mit tubulären und periglomerulären Färbungsmuster nachgewiesen werden. Schließlich haben wir die Expression des interstitiellen Kollagen I untersucht. Blutdrucksenkung führte zu erhöhter α 1-Kollagen I mRNA Expression im gesamten Kortex mit einer Zunahme um das 600fache unter intensivierter Blutdrucksenkung (Abb. 8E).

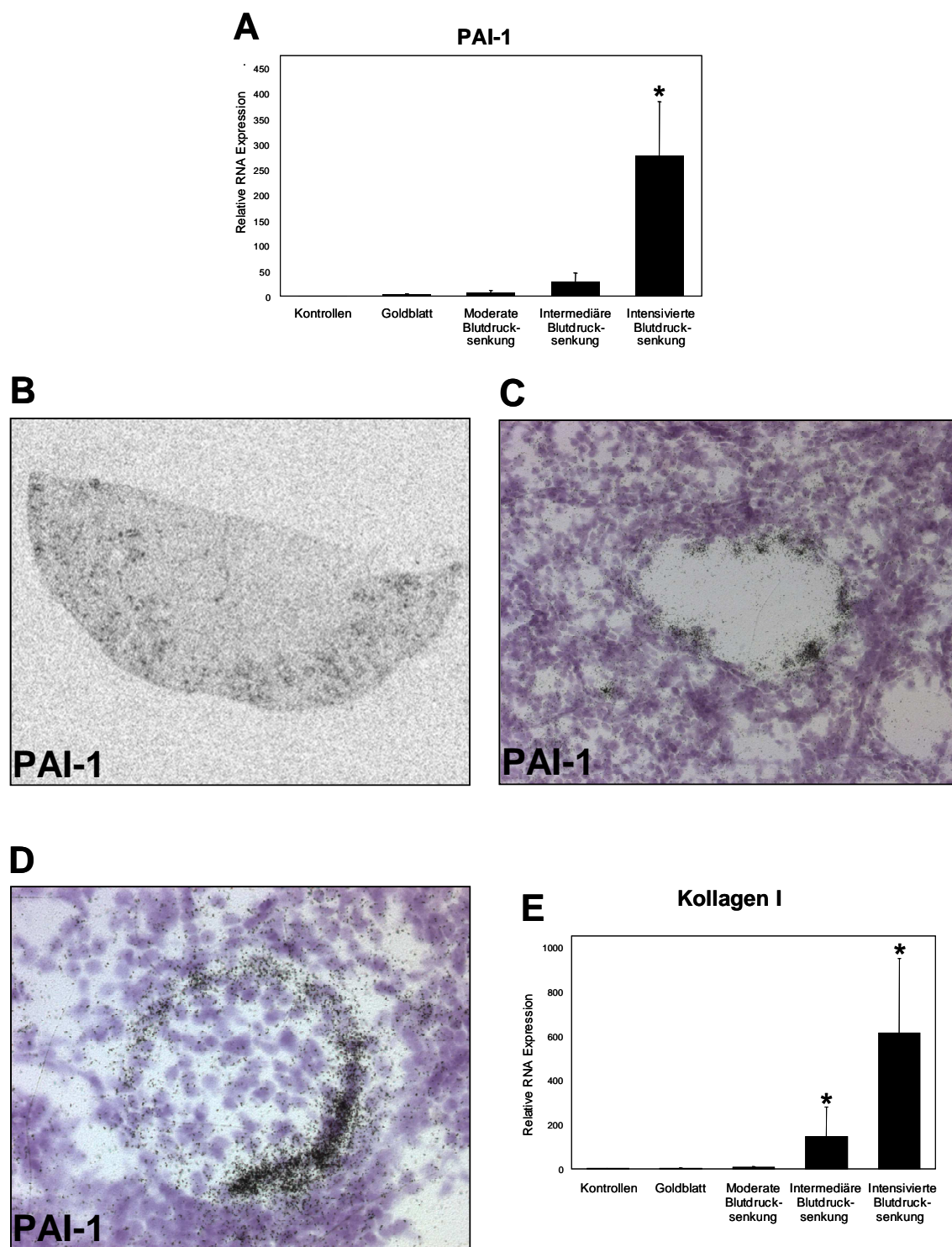


Abb. 8: Fibrosierungsreaktion. RT-PCR der mRNA vom Gesamtnierenkortex zeigte steigende Werte für die mRNA Expression des Plasminogen-Aktivator-Inhibitors-1 (PAI-1) bei Blutdrucksenkung (A). In situ Hybridisierung zeigte eine ausgedehnte Expression des kortikalen Interstitiums (B), einige erkrankte Tubuli (C) und Bowmann'sche Kapseln (D). α 1-Kollagen I mRNA war über das 600 fache in der geklippten Niere von Ratten mit intensivierter Blutdrucksenkung erhöht (E). *P < 0.05 vs. Goldblatt.

3.10. Matrixmetalloproteinasen (MMPs)

Der Matrixbestand ist durch ein Gleichgewicht von Matrixsynthese und -abbau reguliert. Letzteres geschieht durch MMPs. Überraschenderweise war MMP-2 nach Blutdrucksenkung dramatisch hochreguliert, wie durch RT-PCR der mRNA und Zymogramm evaluiert (Abb. 9A und B). Die Densitometrie des Zymogramms ist in Abb. 9C gezeigt. Dies deutet besonders darauf hin, dass MMP-2 ein wichtiger Modulator für tubulointerstitielle Schäden in der geklippten Niere ist.

Ähnlich der Chemokin-Daten, zeigten PCR Analysen der mRNA des Gesamtnierenkortexes von antihypertensiv behandelten normotensiven Ratten keine Veränderungen in Expression von PAI-1 und MMP-2, im Vergleich zu unbehandelten Kontrollen (behandelte versus unbehandelte Ratten: PAI-1 1.0fach, Kollagen I 1.2fach, MMP-2 1.2fach). Dies lässt darauf schließen, dass die beobachteten Effekte keine toxischen oder unspezifischen Effekte des Vasopeptidase-Hemmers oder der Blutdrucksenkung an sich sein können.

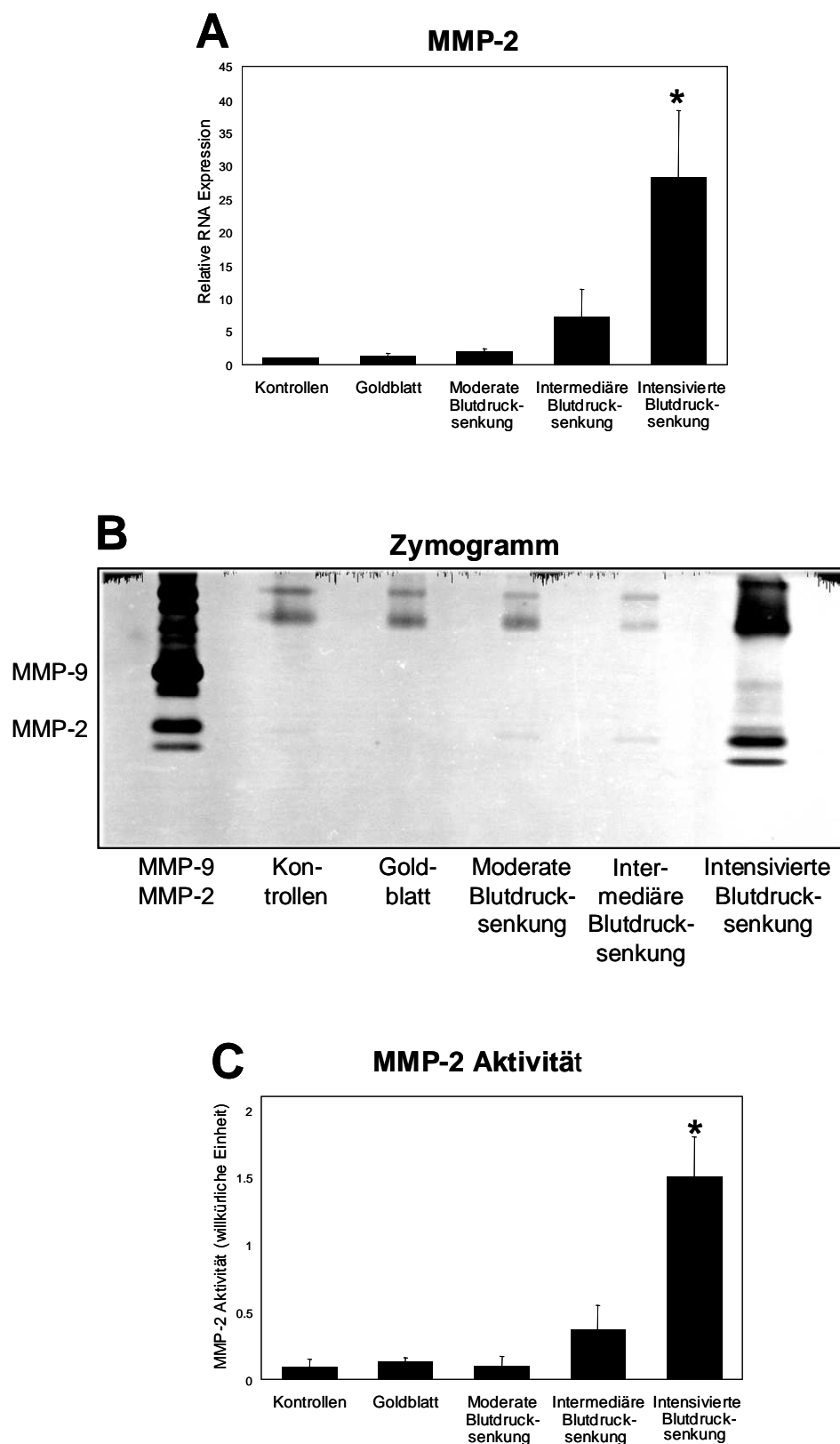


Abb. 9: Matrixmetalloproteinasen (MMPs). RT-PCR Analysen der mRNA des Gesamtnierenkortexes zeigten steigende MMP-2 mRNA Expression mit zunehmender Blutdrucksenkung (A). Das Zymogramm zeigt, dass die erhöhte mRNA Expression mit erhöhter Aktivität einhergeht (B). Die Daten aus 4 Densitometrien sind in C dargestellt. *P < 0.05 vs. Goldblatt.

3.11. Die renale Funktion

Um die Gesamtnierenfunktion zu untersuchen, wurden Plasma-Kreatinin und Kreatinin-Clearance gemessen. Die antihypertensive Therapie verschlechterte dosisabhängig die Nierenfunktion, gemessen an der Kreatinin-Clearance, so dass eine statistische Signifikanz bei der Gruppe mit intensivierter Blutdrucksenkung erreicht wurde. Die Ergebnisse sind in Tab. 3 zu sehen. Eine Erklärung dafür könnte der Funktionsverlust der geklippten Niere sein.

Tab. 3: Plasma-Kreatinin und Kreatinin-Clearance

	Plasma-Kreatinin (mg/dl)	Kreatinin-Clearance (ml/min)
Kontrollen	0.35±0.01	3.1±0.3
Goldblatt	0.41±0.03	3.6±0.6
Moderate Blutdrucksenkung	0.38±0.02	3.1±0.6
Intermediäre Blutdrucksenkung	0.47±0.03	2.4±0.3
Intensivierte Blutdrucksenkung	0.47±0.02	1.8±0.3*

*p<0.0125 vs. Goldblatt

4. Diskussion

Unerwünschte schädliche Wirkungen durch Hemmung des RAS können bei Patienten mit verminderter renaler Perfusion, bedingt durch eine Stenose der Nierenarterien oder arteriosklerotischer Veränderungen der kleinen intrarenalen Arterien, auftreten (23). Um die Pathophysiologie des akuten Nierenversagens durch Blutdrucksenkung genauer zu untersuchen, haben wir für dieses Experiment das 2 Nieren, 1 Klipp Hochdruckmodell von Goldblatt bei Ratten, angewendet. Die tubulointerstitiellen Schäden sind von uns und anderen beschrieben worden (10, 19, 28). Dennoch ist bislang wenig über die Mechanismen und Mediatoren, die der ausgeprägten Inflammation und Fibrose in der geklippten Niere zu Grunde liegen, bekannt.

In der vorliegenden Arbeit haben wir den Blutdruck mit einem Vasopeptidase-Hemmer gesenkt. Vasopeptidase-Hemmer sind eine Klasse von Medikamenten, die gleichzeitig sowohl das RAS, als auch die Neutrale Endopeptidase hemmen. Es konnte gezeigt werden, dass durch Vasopeptidase-Hemmer ein größerer antihypertensiver Effekt erzielt werden konnte, als mit ACE-Hemmern (28). Durch Einsatz des Vasopeptidase-Hemmers als einzelne Wirksubstanz in diesem Experiment, konnte das Einschleppen von Kovariablen, verglichen mit dem Einsatz von blutdrucksenkende Medikamentenkombinationen effektiv vermieden werden. Es wäre von Interesse die Blutdrucksenkung durch Vasopeptidase-Hemmer mit einer Blutdrucksenkung durch eine andere antihypertensive Therapie zu vergleichen, welche das RAS nicht hemmt, um zu unterscheiden, ob die Blutdrucksenkung selbst oder die Hemmung des RAS die Ursache für die Cluster-Formation und den fibrotischen Umbau sind. Jedoch, wie zuvor berichtet, ist es bisher nicht gelungen den Blutdruck in unserem Modell mit einer Dreifach-Kombination (Diuretikum, Hydralazin und Reserpin), ohne ACE-Hemmung, ausreichend zu senken (26, 27).

Zahlreiche inflammatorische Nierenerkrankungen, wie die akute Nierentransplantat-Abstoßung (17, 22) und Glomerulonephritis (21), sind zum erheblichen Teil durch eine Th1-Immunantwort gesteuert. Die charakteristischerweise auf der Oberfläche der T-Zellen vom Th1-Typ gefundenen Chemokin-Rezeptoren sind CXCR3 und CCR5, welche mit ihren korrespondierenden Chemokin-Liganden, IP10, Mig, ITAC, und RANTES bzw. MIP1- α , MIP1- β , entsprechend interagieren.

Die erste neue Erkenntnis der vorliegenden Studie ist, dass zusätzlich zu einer diffusen interstitiellen Leukozyteninfiltration, dichte Cluster von inflammatorischen Zellen in den geklippten Nieren der antihypertensiv behandelten Ratten gefunden wurden. Da die Färbungen für den Proliferationsmarker PCNA negativ waren, kann eher eine Infiltration der Nieren durch die Immunzellen als eine lokale Proliferation, angenommen werden. Darüber hinaus konnten wir zeigen, dass dosisabhängig erhöhte Werte von MCP-1 und von den Th1-Typ Chemokinen, IP10 und Mig, in den Nieren vorhanden waren. Die Immunhistochemie zeigte eine diffuse interstitielle Infiltration durch ED-1-positive Monozyten, wohingegen in den

Clustern CD-3-positive T-Zellen dominierten und ferner auch Monozyten nachgewiesen werden konnten. Die T-Zellen sind wahrscheinlich vom Th1-Phänotyp, da die Nieren eine deutliche Induktion der mRNA-Expression sowohl der Th1-Chemokine IP10 und Mig, wie auch des Th1-Cytokins IFN- γ , vorwiesen. Durch Einsatz von in situ Hybridisierung, haben wir eine intensive Anfärbung für IP10 und Mig exklusiv in den Clustern vorgefunden. MCP-1 positives Signal hingegen, wurde nicht nur in den Clustern, sondern auch in diffuser Verteilung im gesamten Interstitium gefunden. Somit deckte es sich mit dem Verteilungsmuster des ED-1-positiven Zellen. Die In Situ Daten wurden durch Tissue Laser Microdissection bestätigt und dahingehend erweitert, dass die selektive Hochregulation von IP10, Mig, CXCR3 und MCP-1 mRNA in den inflammatorischen Clustern demonstriert werden konnte. In der vorliegenden Studie wird zum erstem Mal eine Formation von Leukozyten-Clustern assoziiert mit einer Kompartiment-spezifischen Chemokin-Expression vom Th1-Typ in der geklippten Niere von antihypertensiv behandelten Goldblatt-Ratten gezeigt. Obwohl die Funktion der beschriebenen Faktoren im tubulointerstitiellen Schädigungsprozess bislang nicht geklärt ist, kann man Folgendes spekulieren:

Die beobachteten Zell-Cluster können möglicherweise als Regionen für die Aktivierung von Monozyten dienen, da sie zahlreiche und wiederholte direkte T-Zell-Monozyten-Kontakte aufweisen, welche wiederum als die potenteste Stimulierung für die Aktivierung von Monozyten erachtet werden. Diese lokale Aktivierung inflammatorischer Zellen innerhalb der Niere vermag auch durch Interaktion von T-Zellen mit antigenpräsentierenden B-Zell-Aggregaten, die ebenfalls gelegentlich in den Clustern vorgefunden werden können, gestützt sein. Allgemein könnten diese Zell-Cluster also der Aktivierung einer rapiden und stabilen Immunantwort unabhängig von regionalen Lymphknoten dienen.

In der vorliegenden Studie wurde eine Th1-Antwort mit nachfolgender Hochregulation von profibrotischen Mediatoren durch einen Vasopeptidase-Hemmer induziert. Es wurde kürzlich demonstriert, dass Nierenschäden in AT-1-Rezeptor-Knockout-Mäusen auch mit einer T-Zell- und Monozyten-Immunantwort, einhergehend mit der Aktivierung inflammatorischer Mediatoren, assoziiert sind. Es ist wahrscheinlich, dass die Mechanismen in beiden Modellen ähnlich sind. Darüberhinaus, ist die Abwesenheit von RAS mit der Entwicklung tubulointerstitieller Inflammation assoziiert (15).

Die zweite neue Erkenntnis ist, dass die Infiltration der inflammatorischen Zellen von einer massiven Induktion profibrotischer Mediatoren in der geklippten Niere nach Blutdrucksenkung begleitet wird. Die Senkung des Blutdrucks in unserem Modell erhöhte dosisabhängig die Akkumulation von Myofibroblasten. Diese Zellen können ortsansässige, aus Knochenmark stammende oder tubuloepitheliale, in Myofibroblasten transformierte, Zellen sein (3, 7, 11). MMPs sind eine Voraussetzung für die epithelial-mesenchymale Transformation (EMT) (11), da die tubulären Zellen nach EMT durch Lücken der tubulären Basalmembran wandern, welche durch Proteasen, wie MMP-2, produziert werden. Es wird generell angenommen, dass die exzessive Matrixakkumulation, die in fibrotischen Nieren gesehen wird, sowohl von einer Überproduktion der Matrixkomponenten, als auch von

Defekten in dessen Abbau resultiert, das heißt durch Hinunterregulation von MMPs. Dennoch, erscheinen frühere Annahmen über Matrix-Proteasen in der renalen Fibrogenese allzu sehr vereinfacht (13). In Mäusen, genetisch verändert, um MMP-2 im proximalen Tubulus zu überproduzieren, untergingen diese Zellen spontan einer epithelial-mesenchymale Transformation und entwickelten peritubuläre Fibrose (2). Darüber hinaus, benutzen Leukozyten selbst MMPs, um sich ihren Weg durch die verschiedenen Schichten von Blutgefäßen zu bahnen, um in das Gewebe einzudringen (16). Demnach sprechen unsere Ergebnisse dafür, dass MMP-2 zusätzliche Funktionen in Inflammation und Fibrose hat. Jüngst, wurde die Aufmerksamkeit auf ein anderes Fibrose-assoziiertes Protein, namens PAI-1, gezogen, welches eine potentielle Rolle in der Matrixregulation hat (5). Es wurde verdeutlicht, dass PAI-1 die renale Fibrose begünstigt (3). Real-time PCR- und In situ Hybridisierungs-Analysen zeigen eine starke und dosisabhängige Induktion von PAI-1 in antihypertensiv behandelten Ratten.

Man könnte argumentieren, die fibrotische Antwort sei durch Hypoxie oder Ischämie getriggert, unabhängig von Inflammation. Dagegen spricht jedoch, dass die beobachtete Inflammation mit einer robusten Kompartiment-spezifischen Expression von Chemokinen und ihrer spezifischen Rezeptoren, in Kombination mit einer diffusen Infiltration von mononukleären Zellen und umschriebenen Zell-Cluster-Formationen, wie in unserer Studie beschrieben, sich deutlich von den Veränderungen im Ischämie/Reperfusion-Modell unterscheidet (4). Den endgültigen Nachweis dafür, dass CXCR3-tragende Leukozyten Inflammation in der geklippten Niere verursachen und die Fibrose triggern, wird die Induktion der Goldblatt-Hypertonie in CXCR3 Knockout-Mäuse erbringen.

Gemäß der vorliegenden Daten, schlußfolgern wir, dass die tubulointerstitiellen Schäden, induziert durch Blutdrucksenkung in der geklippten Niere, beliebig in sequentielle oder überlappende pathogenetische Mechanismen aufgeteilt werden können (14).

Blutdrucksenkung induziert:

1. Initiale renale Schäden begleitet von
2. Hochregulation der Chemokine IP10, Mig und MCP-1, welche
3. eine zelluläre Antwortphase, charakterisiert durch inflammatorische Zell-Cluster-Formationen mit einer Th1-Antwort und einer eher diffusen Monozyteninfiltration triggern.
4. Die Infiltration kann eine Synthese fibrotischer Wachstumsfaktoren, wie PAI-1 und MMPs verursachen, die mit dem Auftreten von Myofibroblasten und EMT im Zusammenhang stehen, wodurch
5. eine exzessive Akkumulation von extrazellulären Matrixproteinen induziert wird.
6. Dies führt schließlich zu einer progressiven Nephron-Destruktion, da interstitielle Kapillaren und Tubuli obliteriert werden.

5. Zusammenfassung

Zusammengefasst, liefert diese Studie die ersten Hinweise für eine Kompartiment-spezifische Expression von Th1-Typ-Chemokinen und ihrer Leukozyten mit lymphoiden Formationen in der geklippten Niere von Goldblatt-Ratten infolge von Blutdrucksenkung. Zudem wurde in dieser Studie gezeigt, dass die Matrixmetalloproteinase MMP-2, ein kritischer Mediator für renale Fibrose, in der geklippten Niere deutlich erhöht ist. Diese Resultate machen deutlich, dass gezielte Intervention an Th1-Chemokinen, wie IP10 und Mig und/oder ihrem korrespondierenden Rezeptor CXCR3, sowie die Hemmung von MMP-2, weiterer Evaluation für die Prävention der ischämischen Nephropathie verdienen.

6. Literaturverzeichnis

1. Camp TM, Smiley LM, Hayden MR, and Tyagi SC. Mechanism of matrix accumulation and glomerulosclerosis in spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens* 21: 1719-1727, 2003.
2. Cheng S, Pollock AS, Olson J, and D. L. Transgenic renal proximal tubular cell expression of active matrix metalloproteinase-2 drives epithelial-mesenchymal transition and interstitial fibrosis. *J Am Soc Nephrol* 15, 37A, 2004.
3. Eddy AA. Can renal fibrosis be reversed? *Pediatr Nephrol* 20: 1369-1375, 2005.
4. Fiorina P, Ansari MJ, Jurewicz M, Barry M, Ricchiuti V, Smith RN, Shea S, Means TK, Auchincloss H, Jr., Luster AD, Sayegh MH, and Abdi R. Role of CXC chemokine receptor 3 pathway in renal ischemic injury. *J Am Soc Nephrol* 17: 716-723, 2006.
5. Fogo AB. Renal fibrosis: not just PAI-1 in the sky. *J Clin Invest* 112: 326-328, 2003.
6. Gauer S, Hartner A, Hauser IA, Fierlbeck W, Eberhardt W, and Geiger H. Differential regulation of osteopontin expression in the clipped and nonclipped kidney of two-kidney, one-clip hypertensive rats. *Am J Hypertens* 16: 214-222, 2003.
7. Haller H, Park JK, Dragun D, Lippoldt A, and Luft FC. Leukocyte infiltration and ICAM-1 expression in two-kidney one-clip hypertension. *Nephrol Dial Transplant* 12: 899-903, 1997.
8. Hamming I, Navis G, Kocks MJ, and van Goor H. ACE inhibition has adverse renal effects during dietary sodium restriction in proteinuric and healthy rats. *J Pathol* 209: 129-139, 2006.
9. Hampshire V: Poorly conducted (or reported) animal tests put humans at risk. *Nature* 407: 671, 2000.
10. Jackson B, Franze L, Sumithran E, and Johnston CI. Pharmacologic nephrectomy with chronic angiotensin converting enzyme inhibitor treatment in renovascular hypertension in the rat. *J Lab Clin Med* 115: 21-27, 1990.
11. Kalluri R and Neilson EG. Epithelial-mesenchymal transition and its implications for fibrosis. *J Clin Invest* 112: 1776-1784, 2003.
12. Kaneto H, Morrissey J, McCracken R, Reyes A, Klahr S: Enalapril reduces collagen typ IV synthesis and expansion of the interstitium in the obstructed rat kidney. *Kidney int*, 45:1637-1647, 1994.

13. Liu Y. Renal fibrosis: new insights into the pathogenesis and therapeutics. *Kidney Int* 69: 213-217, 2006.
14. Matsuo S, Lopez-Guisa JM, Cai X, Okamura DM, Alpers CE, Bumgarner RE, Peters MA, Zhang G, and Eddy AA. Multifunctionality of PAI-1 in fibrogenesis: evidence from obstructive nephropathy in PAI-1-overexpressing mice. *Kidney Int* 67: 2221-2238, 2005.
15. Ouyang X, Le TH, Roncal C, Gersch C, Herrera-Acosta J, Rodriguez-Iturbe B, Coffman TM, Johnson RJ, and Mu W. Th1 inflammatory response with altered expression of profibrotic and vasoactive mediators in AT1A and AT1B double-knockout mice. *Am J Physiol Renal Physiol* 289: F902-910, 2005.
16. Panek AN and Bader M. Matrix reloaded: the matrix metalloproteinase paradox. *Hypertension* 47: 640-641, 2006.
17. Panzer U, Reinking RR, Steinmetz OM, Zahner G, Sudbeck U, Fehr S, Pfalzer B, Schneider A, Thaiss F, Mack M, Conrad S, Huland H, Helmchen U, and Stahl RA. CXCR3 and CCR5 positive T-cell recruitment in acute human renal allograft rejection. *Transplantation* 78: 1341-1350, 2004.
18. Panzer U, Steinmetz OM, Reinking RR, Meyer TN, Fehr S, Schneider A, Zahner G, Wolf G, Helmchen U, Schaerli P, Stahl RA, and Thaiss F. Compartment-specific expression and function of the chemokine IP-10/CXCL10 in a model of renal endothelial microvascular injury. *J Am Soc Nephrol* 17: 454-464, 2006.
19. Rodriguez-Iturbe B, Quiroz Y, Kim CH, and Vaziri ND. Hypertension induced by aortic coarctation above the renal arteries is associated with immune cell infiltration of the kidneys. *Am J Hypertens* 18: 1449-1456, 2005.
20. Rouleau JL, Pfeffer MA, Stewart DJ, Isaac D, Setier F, Kerut EK, Porter CB, Proulx G, Qian C, Block AJ: Comparison of vasopeptidase inhibitor, omapatrilat, and lisinopril on exercise tolerance and morbidity in patients with heart failure: IMPRESS randomised trial. *Lancet* 356:615-20, 2000.
21. Segerer S, Banas B, Wornle M, Schmid H, Cohen CD, Kretzler M, Mack M, Kiss E, Nelson PJ, Schlondorff D, and Grone HJ. CXCR3 is involved in tubulointerstitial injury in human glomerulonephritis. *Am J Pathol* 164: 635-649, 2004.
22. Steinmetz OM, Panzer U, Kneissler U, Harendza S, Lipp M, Helmchen U, and Stahl RA. BCA-1/CXCL13 expression is associated with CXCR5-positive B-cell cluster formation in acute renal transplant rejection. *Kidney Int* 67: 1616-1621, 2005.
23. Toto RD, Mitchell HC, Lee HC, Milam C, and Pettinger WA. Reversible renal insufficiency due to angiotensin converting enzyme inhibitors in hypertensive nephrosclerosis. *Ann Intern Med* 115: 513-519, 1991.

24. Weber MA, Vasopeptidase inhibitors. *Lancet* 35:1525-1532, 2001.
25. Wenzel UO. Angiotensin-converting enzyme inhibitors and progression of renal disease: evidence from clinical studies. *Contrib Nephrol*: 200-211, 2001.
26. Wenzel UO, Helmchen U, Schoeppe W, and Schwietzer G. Combination treatment of enalapril with nitrendipine in rats with renovascular hypertension. *Hypertension* 23: 114-122, 1994.
27. Wenzel UO, Troschau G, Schoeppe W, Helmchen U, and Schwietzer G. Adverse effect of the calcium channel blocker nitrendipine on nephrosclerosis in rats with renovascular hypertension. *Hypertension* 20: 233-241, 1992.
28. Wenzel UO, Wolf G, Jacob I, Schwegler C, Qasqas A, Amann K, Helmchen U, and Stahl RA. Beneficial and adverse renal and vascular effects of the vasopeptidase inhibitor omapatrilat in renovascular hypertensive rats. *Nephrol Dial Transplant* 18: 2005-2013, 2003.
29. Wolf G, Butzmann U, and Wenzel UO. The renin-angiotensin system and progression of renal disease: from hemodynamics to cell biology. *Nephron Physiol* 93: P3-13, 2003.
30. Zahner G, Harendza S, Muller E, Wolf G, Thaiss F, and Stahl RA. Prostaglandin E2 stimulates expression of matrix metalloproteinase 2 in cultured rat mesangial cells. *Kidney Int* 51: 1116-1123, 1997.

7. Danksagung

Mein herzlichster Dank gilt meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. med. Ulrich Wenzel, für die umfangreiche und kontinuierliche Betreuung, sowie wissenschaftliche Begleitung bei allen Schritten der vorliegenden Arbeit über die Jahre, in denen ich unter seiner Anleitung an diesem Projekt arbeiten durfte. Seiner außerordentlichen und unermüdlichen Unterstützung habe ich zu verdanken, dass ich mich in fachlicher, sowie persönlicher Hinsicht durch diese Zeit hindurch wesentlich weiterentwickeln konnte.

Herrn Prof. R.A.K. Stahl danke ich für die Unterstützung bei der Durchführung der Arbeit in der III. Medizinischen Klinik am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf. Ebenso möchte ich mich bei Herrn Dr. med. Oliver Steinmetz aus derselben Abteilung für seine Bemühungen bei dieser Arbeit bedanken.

Ich danke Frau Saskia Schröder, Anne Peters und Mariola Rezska, Mitarbeiterinnen des Nephrologischen Labors, für ihre umfangreiche Unterstützung bei der Durchführung der Experimente.

Mein Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. Udo Helmchen im Institut für Pathologie des Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf und Frau Inge Hamming des Universitätskrankenhauses in Groningen, Holland, Abteilung Pathologie, für die Bereitstellung und Färbung der histologischen Präparate.

Ebenso möchte ich mich an dieser Stelle herzlich bei meiner Familie, insbesondere meinen Eltern für deren Unterstützungen in jeglicher Hinsicht während der Dauer der Doktorarbeit und des Studiums bedanken. Für die grammatikalische und syntaktische Durchsicht bedanke ich mich herzlich bei meiner Schwester.

Besonders möchte ich mich an dieser Stelle bei meinem Lehrer, Herrn Nader Angha, bedanken, der mir auch in schwierigsten Situationen in meinem Leben stets Mut machte mein Bestes zu versuchen und mir höhere Ziele zu setzen, auf das Beste zu hoffen und das Größte zu wagen.

Diese Arbeit wurde unterstützt durch Sanofi Aventis (Frankfurt, Deutschland).

Teile dieser Arbeit sind publiziert worden:

Steinmetz O, Sadaghiani S, Panzer U, Krebs C, Meyer-Schwesinger C, Streichert T, Fehr S, Hamming I, van Goor H, Stahl RAK and U Wenzel: Antihypertensive Therapy induces compartment specific chemokine expression and a Th-1 immune response in the clipped kidney of Goldblatt hypertensive rats, *Am J Physiol* 2007 Feb; 292(2): F876-87

9. Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt, und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlichgemacht habe. Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Unterschrift:.....