

UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

III. Medizinische Klinik

Prof. Dr. med. Rolf A. K. Stahl

AT₂-Agonismus bei Nierenerkrankungen

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

vorgelegt von:

Jana Maren Baucke
aus Uelzen

Hamburg 2011

**Angenommen von der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 04.06.2012**

**Veröffentlicht mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.**

Prüfungsausschuss, der Vorsitzende: Prof. Dr. U. Wenzel

Prüfungsausschuss, zweiter Gutachter: PD Dr. K. Sydow

Prüfungsausschuss, dritter Gutachter: Prof. Dr. U. Panzer

Inhaltsverzeichnis

1. Arbeitshypothese und Zielsetzung	1
2. Einleitung.....	2
2.1 Das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS)	2
2.2 Medizinische Relevanz.....	3
2.3 Pharmakologische Modulation des RAAS	3
2.3.1 ACE-Hemmer	3
2.3.2 AT ₁ -Antagonist.....	4
2.3.3 Renin-Inhibitor	4
2.4 Neue Therapieoption – Stimulation des AT ₂ -Rezeptors.....	5
2.4.1 AT ₂ -Agonist.....	5
3. Material und Methoden.....	7
3.1 Versuchsbeschreibungen	7
3.1.1 Wahl der Applikationsart.....	7
3.1.2 Hauptversuch - Unilaterale Ureterobstruktion (UUO).....	8
3.1.3 Positivkontrolle mit Losartan und Aliskiren	8
3.1.4 Versuchsdurchführung in einem anderen Mausstamm.....	9
3.1.5 Vorzeitige Organentnahme an Tag 3 nach UUO	9
3.2 Tierexperiment.....	10
3.2.1 Tierversuchsgenehmigung	10
3.2.2 Versuchstiere.....	10
3.2.3 Haltungsbedingungen.....	10
3.2.4 Bestimmung des Körpergewichtes	11
3.2.5 Verwendetes Futter	11
3.2.6 Compound 21-Spezialfutter	11
3.2.7 Verwendetes Trinkwasser	11
3.2.8 Losartan-Therapie	12
3.2.9 Aliskiren-Therapie.....	12
3.2.10 Verwendete Chemikalien.....	13

3.3 Operative Verfahren und Organentnahme	14
3.3.1 Allgemeine OP-Vorbereitung	14
3.3.2 Implantation mikro-osmotischer Pumpen.....	14
3.3.3 Unilaterale Ureterobstruktion (UUO).....	14
3.3.4 Organentnahme.....	15
3.3.5 Gewinnung und Analyse von Plasma	15
3.3.6 Bestimmung der Plasmaspiegel	16
3.3.7 Bestimmung der Angiotensin I-Plasmaspiegel	16
3.4 Genexpression.....	16
3.4.1 RNA-Isolation.....	16
3.4.2 Konzentrationsbestimmung der RNA.....	18
3.4.3 cDNA-Synthese	18
3.4.4 Realtime RT-PCR	19
3.4.5 Auswertung der Realtime RT-PCR.....	21
3.5 Histologie	22
3.5.1 Fixierung des Nierengewebes	22
3.5.2 Einbettung des Nierengewebes.....	22
3.5.3 Schneiden der Paraffinblöcke.....	23
3.5.4 Backen der Schnitte.....	23
3.5.5 Deparaffinierung	23
3.5.6 PAS-Färbung.....	23
3.5.7 Messung des prozentualen Interstitiumanteils.....	24
3.5.8 CD3-Färbung.....	25
3.5.9 F4/80-Färbung.....	27
3.5.10 Auszählung CD3- und F4/80-positiver Zellen	28
3.5.11 Renin-Färbung.....	28
3.6 Statistik	28
4. Ergebnisse	29
4.1 Wahl der Applikationsart.....	29
4.2 Unilaterale Ureterobstruktion (UUO)	30
4.2.1 Dosis-Wirkungs-Kurve	31
4.2.1.1 Die ideale Dosis	31

4.2.2	Körpergewicht.....	32
4.2.3	Retentionsparameter	32
4.2.4	Relatives Nierengewicht	34
4.2.5	Verbreiterung des Interstitiums	35
4.2.6	Fibrose.....	36
4.2.7	Monozyten	37
4.2.8	T-Zellen	39
4.3.	Positivkontrolle.....	41
4.3.1	Wahl der Losartan-Dosis	41
4.3.2	Gruppeneinteilung	42
4.3.3	Körpergewicht.....	42
4.3.4	Retentionsparameter	43
4.3.5	Relatives Nierengewicht	44
4.3.6	Verbreiterung des Interstitiums	45
4.3.7	Monozyten	46
4.3.8	T-Zellen	47
4.3.9	Fibrose.....	49
4.3.10	Nachweis klinisch relevanter Plasmaspiegel	49
4.4	Vorzeitige Organentnahme an Tag 3 nach UUO.....	50
4.4.1	Körpergewicht.....	50
4.4.2	Relatives Nierengewicht	51
4.4.3	Verbreiterung des Interstitiums	51
4.4.4	Fibrose.....	52
4.4.5	Monozyten	53
4.4.6	T-Zellen	54
4.4.7	Nachweis klinisch relevanter Plasmaspiegel	55
5.	Diskussion	56
5.1	Wahl des Mausstammes	56
5.2	Wahl der Versuchsdauer	57
5.3	Ergebnisse.....	57
5.3.1	Applikation von Compound 21	57
5.3.2	Hauptversuch – 7 Tage UUO.....	58
5.3.2.1	Fazit	59

5.3.3	Positivkontrolle.....	61
5.3.3.1	Fazit	62
5.3.4	Vorzeitige Organentnahme an Tag 3 nach UUO	63
5.3.4.1	Fazit	64
6.	Zusammenfassung	65
6.1	Kritische Reflexion der Arbeit	66
7.	Ausblick	69
7.1	Konsequenzen für Compound 21	69
7.2	Sinnvolle Folgeversuche.....	70
8.	Abkürzungsverzeichnis.....	71
9.	Literaturverzeichnis	73
10.	Danksagung	80
11.	Lebenslauf	81
12.	Eidesstattliche Erklärung	82

1. Arbeitshypothese und Zielsetzung

Während die Funktion des AT₁-Rezeptors relativ gut erforscht ist, war die Funktion des AT₂-Rezeptors lange Zeit weitestgehend unklar. Dies lag vor allem daran, dass die zahlreichen, publizierten Versuche unter Verwendung des AT₂-Antagonisten PD123319 widersprüchliche Ergebnisse lieferten. Es konnte somit nicht endgültig bewiesen werden, ob der AT₂-Rezeptor protektiv [1-4], schädlich [5-9] oder wirkungslos [10] ist. Um die Funktion des AT₂-Rezeptors näher zu charakterisieren, musste man sich also von Hemmstoffen wie dem PD123319 lösen. Aus diesem Grund wurden Versuche mit AT₂-Knockout-Mäusen auf FVB-Hintergrund durchgeführt, um anhand der Folgen einer AT₂-Rezeptor-Defizienz Rückschlüsse auf die Funktion des AT₂-Rezeptors ziehen zu können. Hierbei zeigte sich, dass AT₂-Rezeptor-Defizienz Nierenschäden, Fibrose und Inflammation nach renaler Ablation aggraviert und zu erhöhter Mortalität führt [11]. Das impliziert, beweist jedoch noch nicht, dass AT₂-Rezeptor-Stimulation antiinflammatorisch, antifibrotisch und somit nephroprotektiv ist. Da Angiotensin II sowohl an den AT₂- als auch an den AT₁-Rezeptor bindet, ist es für derartige Stimulationsversuche des AT₂-Rezeptors nicht geeignet. Mit einer Bindungskonstanten K_i von 0,4 nM für den AT₂-Rezeptor und einer K_i von mehr als 10 μ M für den AT₁-Rezeptor ist Compound 21 (C21) der erste nicht-peptiderge, hochselektive AT₂-Agonist, der Ratten mit einer Halbwertszeit von vier Stunden parenteral appliziert wurde [12]. Im Rahmen von Stimulationsversuchen wurde bereits gezeigt, dass die selektive Stimulation des AT₂-Rezeptors mit Compound 21 sowohl neuro- [13] als auch kardioprotektiv [14] ist.

Ziel meiner Dissertation ist es, im Modell der unilateralen Ureterobstruktion zu prüfen, ob die Stimulation des AT₂-Rezeptors mit dem selektiven AT₂-Agonisten Compound 21 antiinflammatorisch, antifibrotisch und somit nephroprotektiv wirkt.

Da Compound 21 bislang nur bei Ratten parenteral oder intraperitoneal appliziert wurde, muss zunächst überprüft werden, ob es Mäusen mit einer 24-Stunden-Wirksamkeit oral über das Futter appliziert werden kann.

2. Einleitung

2.1 Das Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems (RAAS)

Die Protease Renin spaltet von dem in der Leber gebildeten Angiotensinogen das Dekapeptid Angiotensin I ab, welches durch das Angiotensin-Konversionsenzym (ACE) in das Oktapeptid Angiotensin II umgewandelt wird. Angiotensin II bindet hauptsächlich an zwei Rezeptoren: den AT₁- und den AT₂-Rezeptor. Über den G-Protein gekoppelten AT₁-Rezeptor führt Angiotensin II zu Entzündung, Vasokonstriktion, Albuminurie und zur Bildung von O₂-Radikalen. Hemmt man diese schädlichen Funktionen des AT₁-Rezeptors mit AT₁-Antagonisten, so führt dies durch den Wegfall des negativen Feedbacks zu einer Erhöhung der Renin-Ausschüttung. Die Funktion des AT₂-Rezeptors ist hingegen weitestgehend unklar. Es ist jedoch bekannt, dass der AT₂-Rezeptor bei Inflammation und anderen pathologischen Prozessen hochreguliert wird [15].

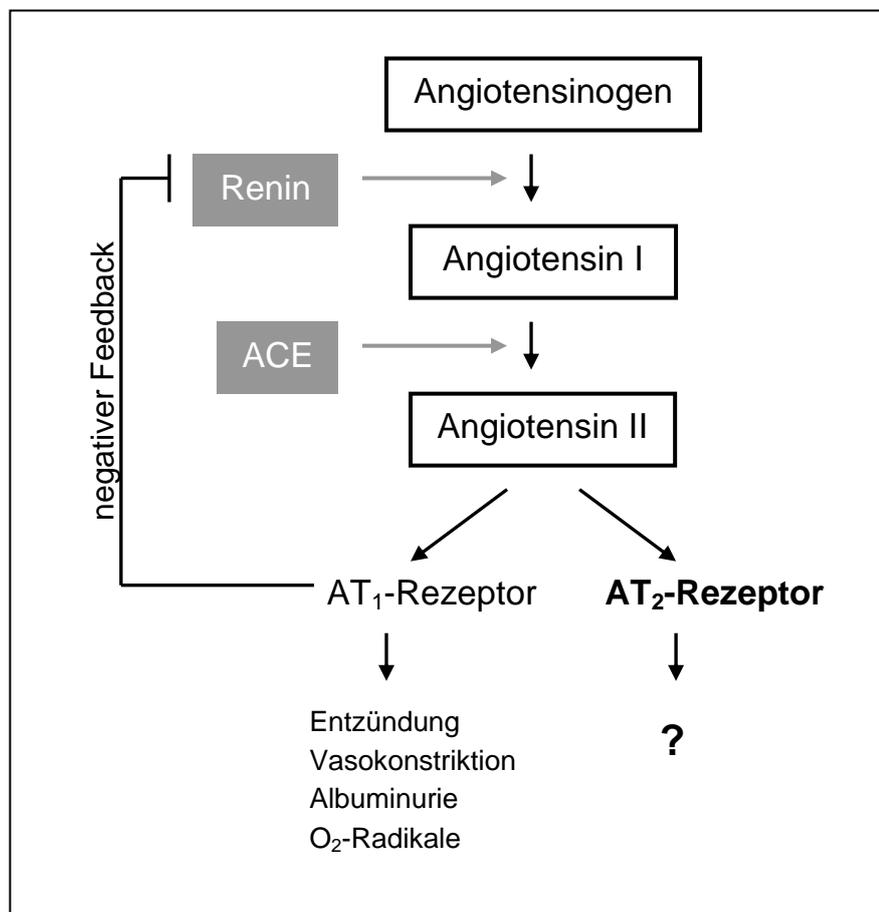


Abb. 1: Vereinfachte Darstellung des Renin-Angiotensin-Systems.

Angiotensin II führt zudem zu der Freisetzung des Mineralokortikoids Aldosteron in der Zona glomerulosa der Nebenniere, welches durch vermehrten Einbau von ENaC-Kanälen die Natriumreabsorption und Kaliumausscheidung im distalen Tubulus der Niere fördert. Das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS) reguliert durch Natrium- und Wasserretention die Menge und Zusammensetzung der extrazellulären Flüssigkeit und moduliert somit auch die Höhe des Blutdrucks. Hypotonie, Hypovolämie, Hyponatriämie, verminderte Nierendurchblutung und Sympathikusaktivierung führen zu einer Hochregulierung des RAAS.

2.2 Medizinische Relevanz

Laut dem Bundes-Gesundheitssurvey 1998 leiden in Deutschland 44 % der Frauen und 51 % der Männer zwischen 18 und 79 Jahren an einer arteriellen Hypertonie. Somit zählt die arterielle Hypertonie in Deutschland zu den so genannten Volkskrankheiten. Da ein arterieller Hypertonus neben Fettstoffwechselstörungen einer der Hauptrisikofaktoren für arteriosklerotische Gefäßveränderungen ist, sind die Folgeerkrankungen vielschichtig. Hypertoniker weisen gegenüber Personen mit normalem Blutdruck unter anderem ein mehrfach erhöhtes Risiko für ischämische Schlaganfälle (7-fach), eine Niereninsuffizienz (6-fach), eine Herzinsuffizienz (4-fach) oder Herzinfarkte (3-fach) auf. Auch die Retinopathie mit fundus hypertonicus oder Durchblutungsstörungen der Beine zählen zu den möglichen Folgeerkrankungen.

2.3 Pharmakologische Modulation des RAAS

2.3.1 ACE-Hemmer

Das Angiotensin-Konversionsenzym (ACE) wurde 1956 von Leonard T. Skeggs erstmals im Plasma nachgewiesen [16]. In Brasilien isolierte die Arbeitsgruppe um den Forscher Sergio Ferreira 1967 aus dem Gift der südamerikanischen Jararaca-Lanzenotter (lat. *bothrops jararaca*) das Bradikinin potenzierende Pentapeptid (BPP_{5a}) und entdeckte somit den ersten natürlichen Inhibitor des Angiotensin-Konversionsenzym [17]. Der Chemiker Miguel A. Ondetti synthetisierte 1977 Captopril, den ersten oral verfügbaren ACE-Hemmer zur antihypertensiven Therapie [18].

Unter der kompetitiven Hemmung des Angiotensin-Konversionsenzym sinken die Angiotensin II-Spiegel. Somit ist sowohl die Stimulation des AT₁- als auch die des AT₂-Rezeptors nahezu komplett unterbunden.

2.3.2 AT₁-Antagonist

Der erste, oral verfügbare AT₁-Antagonist Losartan, ein Imidazolderivat mit Diphenyltetrazolgruppe, wurde von DuPont (Wilmington, DE, USA) entdeckt [19] und 1995 von DuPont Merck auf den deutschen Markt gebracht. Unter selektiver Blockade des AT₁-Rezeptors fällt der negative Feedback weg, wodurch die relative Renin-Expression und in der Folge auch die Angiotensin II-Spiegel ansteigen. Unter dieser AT₁-Rezeptor-Blockade kann das Angiotensin II lediglich an den AT₂-Rezeptor binden. Folglich ist die Stimulation des AT₂-Rezeptors unter AT₁-Rezeptor-Blockade verstärkt. Wäre der AT₂-Rezeptor tatsächlich nephroprotektiv, so würde man vermuten, dass die Therapie mit AT₁-Antagonisten der Therapie mit ACE-Hemmern überlegen ist, da nur bei ersterer der protektive AT₂-Rezeptor stimuliert wird. Diese Hypothese wurde bislang noch nicht in einer Superiority Studie überprüft. In einer Non-Inferiority Studie (ONTARGET [20]) wurde gezeigt, dass der AT₁-Antagonist Telmisartan dem ACE-Hemmer Enalapril nicht unterlegen und weniger häufig mit Angioödemem assoziiert ist [20]. Die Kombination beider Medikamente brachte keinen zusätzlichen Benefit, führte jedoch vermehrt zu Nebenwirkungen [21]. Es ist zu klären, ob das körpereigene Angiotensin II den AT₂-Rezeptor unter selektiver AT₁-Rezeptor-Blockade ausreichend stimuliert oder ob für einen nachweisbaren Effekt ein selektiver AT₂-Agonist erforderlich ist.

2.3.3 Renin-Inhibitor

Aliskiren (Novartis, Basel, Schweiz), der erste humane Renin-Inhibitor, ist seit 2007 als neue Substanzklasse zur antihypertensiven Therapie auf dem europäischen Markt zugelassen. Unter der Hemmung von Renin, dem geschwindigkeitsbestimmenden Faktor des RAAS, ist das komplette RAAS inklusive aller Isoenzyme gehemmt [22]. Somit ist sowohl die Stimulation des AT₁- als auch die des AT₂-Rezeptors unterbunden.

2.4 Neue Therapieoption – Stimulation des AT₂-Rezeptors

Der AT₂-Rezeptor besitzt sieben Transmembrandomänen, ist jedoch mit keinem der klassischen Second Messenger wie cAMP oder Inositoltriphosphat gekoppelt. Über die Frage, ob der AT₂-Rezeptor an ein G_{αi}-Protein gekoppelt ist besteht keine Einigkeit [12]. Der AT₂-Rezeptor weist eine deutlich niedrigere Expression als der AT₁-Rezeptor auf [23]. In den meisten fetalen Geweben ist der AT₂-Rezeptor hoch exprimiert. Die AT₂-/AT₁-Rezeptor-Ratio sinkt nach der Geburt jedoch dramatisch ab [24-25]. Dies lässt eine Beteiligung des AT₂-Rezeptors an der fetalen Entwicklung vermuten. Unter folgenden pathologischen Bedingungen ist auch beim Erwachsenen die Expression des AT₂-Rezeptors hochreguliert: Herzinsuffizienz, Niereninsuffizienz, Gehirnschäden [12], Myokardinfarkt [26], vaskuläre Erkrankungen [27] und Wundheilung [28]. Die Wirkung des AT₂-Rezeptors erscheint oft gegensätzlich zu der des AT₁-Rezeptors [12]. Im Erwachsenen führt die Aktivierung des AT₂-Rezeptors zu folgenden Effekten: Vasodilatation, Inhibition der Zellproliferation, extrazelluläres Matrix-Remodeling, axonale Regeneration und Induktion des programmierten Zelltods [12].

2.4.1 AT₂-Agonist

Der erste nicht-peptiderge, selektive AT₂-Agonist Compound 21 wurde im schwedischen Uppsala entwickelt und ist über Vicore Pharma (Göteborg, Schweden) erhältlich [14]. Compound 21 leitet sich von dem nicht-selektiven AT₁/AT₂-Rezeptor-Agonisten L-162,313 ab und wurde mit der höchsten Affinität und Selektivität für weitere in vitro und in vivo Studien gewählt [12]. Mit einer Bindungskonstanten K_i von mehr als 10 µM für den AT₁-Rezeptor und einer K_i von 0,4 nM für den AT₂-Rezeptor beträgt die sogenannte AT₁/AT₂-Ratio > 25 000 [12]. Die Halbwertszeit des AT₂-Agonisten Compound 21 liegt in der Ratte zwischen 3 und 6 Stunden, während die Bioverfügbarkeit bei oraler Applikation 20-30% beträgt [12]. NG 108-15 Zellen exprimieren nachweislich nur den AT₂-Rezeptor [29-30]. In vitro führte die Stimulation dieser Zellen mit 0,1 µM Compound 21 zum Auswachsen und zur Ausdehnung von Neuriten, zur Modulation der neuronalen Erregbarkeit sowie zur Förderung der Zell-Migration [29-30].

Diese Effekte sind durch den AT₂-Antagonisten PD 123319 hemmbar, was beweist, dass sie auf der Stimulation des AT₂-Rezeptors durch Compound 21 beruhen [29-30]. Es wurde bereits in spontan hypertensiven, Schlaganfall anfälligen Ratten (SHRSPs) gezeigt, dass Compound 21 nach induziertem Schlaganfall zu einer signifikanten Reduktion des ischämischen Gebietes und der Mortalität führt [13]. Zudem zeigte Compound 21 auch nach induziertem Myokardinfarkt in Wistar Ratten einen Benefit, welcher sich durch eine verbesserte diastolische und systolische Ventrikelfunktion sowie eine signifikant kleinere Infarktnarbe äußerte. Die signifikante Reduktion des Chemokins MCP-1 und des granulozytären Enzyms Myeloperoxidase lassen zudem eine antiinflammatorische Wirkung vermuten [14].

3. Material und Methoden

3.1 Versuchsbeschreibungen

3.1.1 Wahl der Applikationsart

Da Mäuse laut Literatur als dämmerungs- bzw. nachtaktiv gelten und somit hauptsächlich nachts fressen, wurde zunächst untersucht wie sich die Plasmaspiegel nach morgendlichem Absetzen des Compound 21-Spezialfutters im Tagesverlauf verhalten. Klinisch relevant ist unter anderem nach welcher Zeit die Compound 21-Plasmaspiegel auf die Hälfte abgesunken sind.

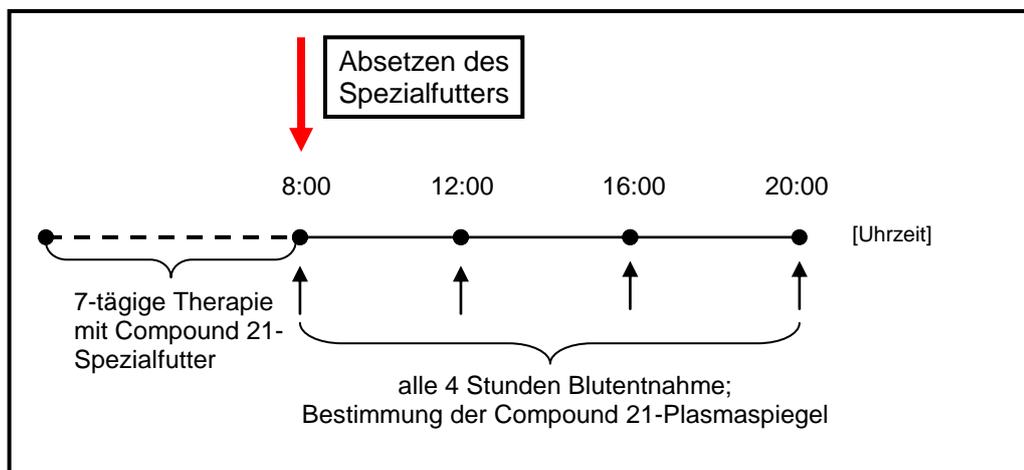


Abb. 2: Versuchsskizze – Plasmaspiegel-Abfall nach Absetzen des Spezialfutters.

Für die nachfolgenden Versuche ist eine 24-Stunden-Wirksamkeit mit konstanten, wirksamen Plasmaspiegeln unerlässlich. Um zu überprüfen, ob diese trotz Nachtaktivität bei oraler Applikation des AT_2 -Agonisten Compound 21 in Form von Spezialfutter gewährleistet ist, wurden zudem die Plasmaspiegel morgens um 8 Uhr und abends um 20 Uhr bestimmt und miteinander verglichen. Das Compound 21-Spezialfutter wurde dabei tagsüber nicht abgesetzt.

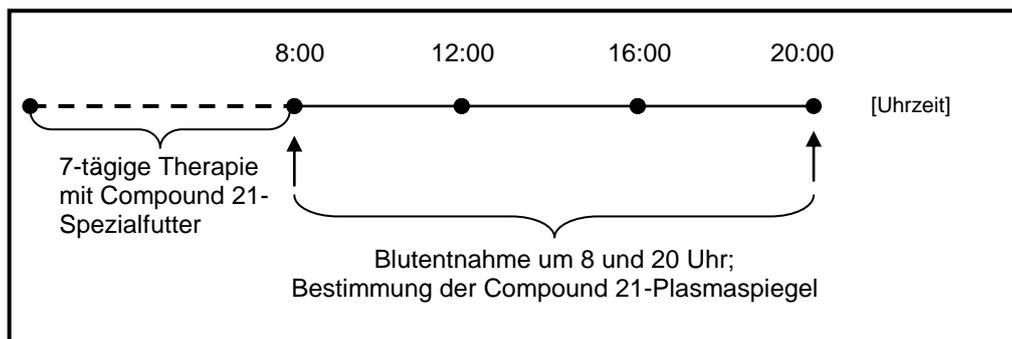


Abb. 3: Versuchsskizze – 24-Stunden-Wirksamkeit.

3.1.2 Hauptversuch - Unilaterale Ureterobstruktion (UUO)

Dieses gut reproduzierbare, weit verbreitete Modell stellt für die Ermittlung der optimalen Dosis des neuen AT_2 -Agonisten Compound 21 ein gutes Modell einer Nierenerkrankung dar. Die im UKE gezüchteten FVB-Mäuse werden im Alter von 8 Wochen in die spezifisch Pathogen freie Barriere gebracht. Nach einer einwöchigen Eingewöhnungsphase werden die Mäuse gewogen, markiert und in die folgenden sechs Gruppen randomisiert:

1. scheinoperierte Mäuse (Kontrollen)
2. UUO ohne Therapie
- 3.-6. UUO unter Therapie mit vier verschiedenen Dosen Compound 21

Nach einwöchiger Therapie erfolgt die UUO, eine Abbindung des rechten Ureters. Der resultierende Harnstau führt zu Inflammation [31] und Fibrose [32]. Sieben Tage nach der UUO erfolgt die Organentnahme.

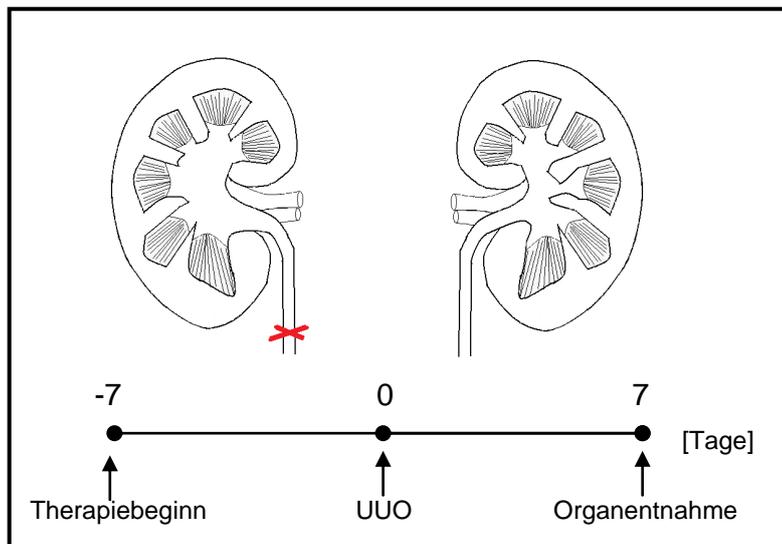


Abb. 4: Versuchsskizze – Unilaterale Ureterobstruktion (UUO).

3.1.3 Positivkontrolle mit Losartan und Aliskiren

Unter identischen Rahmenbedingungen erfolgt eine Positivkontrolle mit dem AT_1 -Antagonisten Losartan, welcher bereits in Ratten in dem Modell der unilateralen Obstruktion einen nephroprotektiven Effekt zeigte [33] und als Positivkontrolle diente [34-35]. Als zweite Positivkontrolle wird der Renin-Inhibitor Aliskiren verwendet, dessen nephroprotektive Wirkung in diesem Modell noch nicht belegt ist.

3.1.4 Versuchsdurchführung in einem anderen Mausstamm

Da 7 Tage nach der UUO auch die Positivkontrolle mit Losartan und Aliskiren keinen Benefit brachte, wurde der Versuch erneut in dem häufig verwendeten Mausstamm C57BL/6 durchgeführt. Um die Wirkung des AT₁-Antagonisten Losartan und des Renin-Inhibitors Aliskiren auch zu einem früheren Zeitpunkt der Nierenschädigung, an Tag 3 nach UUO, untersuchen zu können, wurde der Versuch zweigeteilt. Somit konnten zwei voneinander unabhängige Versuche gleichzeitig unter identischen Rahmenbedingungen durchgeführt werden.

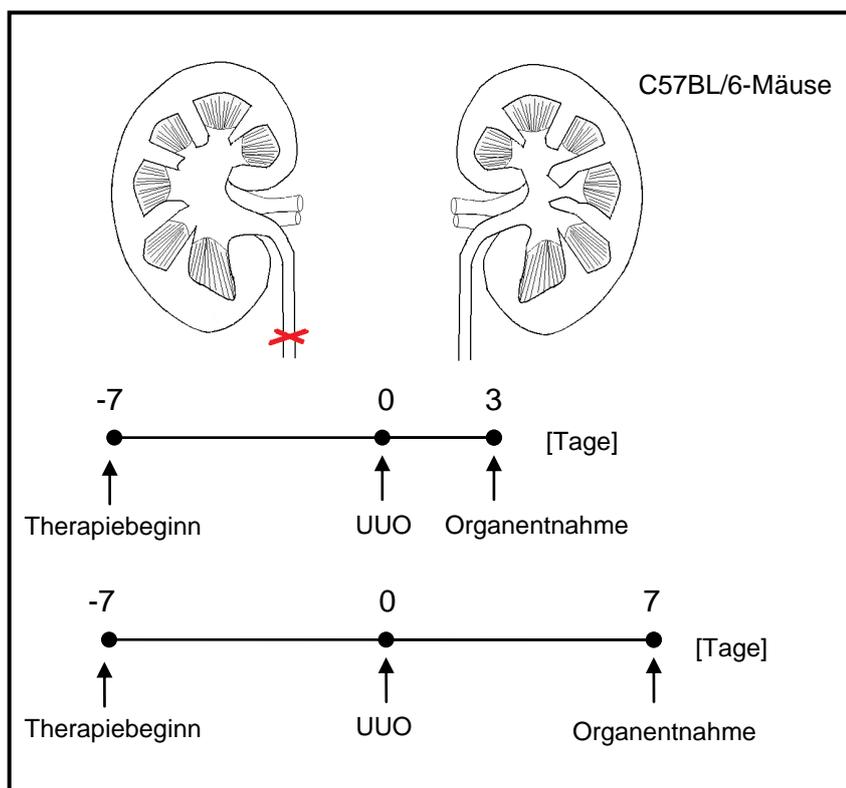


Abb. 5: Versuchsskizze – UUO (3 vs. 7 Tage) in C57BL/6-Mäusen.

3.1.5 Vorzeitige Organentnahme an Tag 3 nach UUO

Die zweizeitige Organentnahme an Tag 3 und 7 nach UUO in C57BL/6-Mäusen zeigte, dass die Positivkontrolle an Tag 7 auch in diesem häufig verwendeten Mausstamm negativ, an Tag 3 jedoch tendenziell positiv ausfällt. Aus diesem Grund wurde die nephroprotective Wirkung der Positivkontrollen, Losartan und Aliskiren, abschließend auch in FVB-Mäusen in dieser früheren Phase des Harnstaus untersucht. Zudem wurde auch die gemäß pharmakologischen Überlegungen ideale Dosis des AT₂-Agonisten Compound 21 auf Nephroprotektion hin getestet.

3.2 Tierexperiment

3.2.1 Tierversuchsgenehmigung

Für die unter 3.1 beschriebenen Versuche ist eine Tierversuchsgenehmigung vorhanden (69-08).

3.2.2 Versuchstiere

Sowohl die verwendeten FVB- als auch die C57BL/6-Mäuse entstammen UKE-internen Zuchtlinien und werden über ein Computerprogramm namens T-Base verwaltet. Für die Versuche werden nur männliche Mäuse verwendet. Eine Woche vor Versuchsbeginn werden sie von der Zucht in die spezifisch Pathogen freie Barriere gebracht. Nach einer einwöchigen Eingewöhnungsphase werden die Mäuse gewogen, randomisiert und durch spezifische Ohrlochung markiert.

3.2.3 Haltungsbedingungen

In der spezifisch Pathogen freien Barriere werden die Mäuse in einem offenen Regalsystem mit mindestens 10-15 Luftwechseln pro Stunde gehalten. Pro Käfig mit Einstreu (1284L, Eurostandard Typ II long; Tecniplast, Hohenpeißenberg, Deutschland) befinden sich 2-4 Mäuse. Die Käfige sind mit einem Gitterdeckel verschlossen. Als so genanntes Enrichment erhält jeder Käfig ein Plastikhaus sowie Zellstoff als Nestbaumaterial. Nach der Randomisierung werden die Gruppen aufmerksam beobachtet, um Bissverletzungen frühzeitig zu erkennen und diese gegebenenfalls durch Trennung der Gruppe zu unterbinden.

Tabelle 1: *Haltungsbedingungen*

<i>Temperatur</i>	22 ± 2 °C
<i>Luftfeuchtigkeit</i>	55 ± 15 %
<i>Beleuchtung</i>	< 250 lux im Raum
<i>Hell-Dunkel-Zyklus</i>	alle 12 Stunden
<i>Geräusche</i>	< 60 dB

3.2.4 Bestimmung des Körpergewichtes

Das Körpergewicht wird bei Therapiebeginn, am Tag der UUO und bei Organentnahme mit einer handelsüblichen Küchenwaage bis auf zwei Nachkommastellen bestimmt und notiert.

3.2.5 Verwendetes Futter

SSniff Standardmausfutter R/M-H (ssniff, Soest, Deutschland).

3.2.6 Compound 21-Spezialfutter

Das von der Tierhaltung verwendete Standardmausfutter R/M-H wurde vom Hersteller ssniff mit zuvor abgewogenen Mengen des wasserlöslichen AT₂-Agonisten Compound 21 (Vicore Pharma, Göteborg, Schweden) versetzt und jeweils mit unterschiedlichen Lebensmittelfarben gefärbt.

1. 10 mg Compound 21 auf 5 kg Futter → 2 mg C21/kg Futter
gelbe Lebensmittelfarbe
2. 50 mg Compound 21 auf 5 kg Futter → 10 mg C21/kg Futter.
grüne Lebensmittelfarbe
3. 150 mg Compound 21 auf 5 kg Futter → 30 mg C21/kg Futter.
rote Lebensmittelfarbe
4. 500 mg Compound 21 auf 5 kg Futter → 100 mg C21/kg Futter.
blaue Lebensmittelfarbe

Das Futter wird im Kühlraum bei 4 °C gelagert.

3.2.7 Verwendetes Trinkwasser

Jeder Käfig erhält zweimal pro Woche frisches Leitungswasser in zuvor sterilisierten Trinkwasserflaschen.

Postoperativ wird das Trinkwasser drei Tage lang mit dem Analgetikum Novalminsulfon-ratiopharm (500 mg Metamizol-Natrium 1 H₂O/ml, 1 ml ~ 20 Tropfen; ratiopharm, Ulm, Deutschland) vermengt. Dosierung: 16 Tropfen ad 300 ml.

3.2.8 Losartan-Therapie

Der AT₁-Antagonist Losartan (MSD, Haar, Deutschland) wird mit einer Feinwaage (R 160 P; Sartorius, Aubagne Cedex, Frankreich) in 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäße (Eppis) abgewogen und in der Barriere des Tierstalls mit jeweils 300 ml Trinkwasser vermengt.

- 150 mg Losartan ad 300 ml Trinkwasser = 500 mg Losartan/l

3.2.9 Aliskiren-Therapie

Um eine Dosis von 50 mg Aliskiren (Novartis, Basel, Schweiz) pro kg Körpergewicht (KG) mittels mikro-osmotischer Pumpen (Alzet Modell 1002; DURECT Corporation, Cupertino, CA, USA) applizieren zu können, muss zunächst anhand des durchschnittlichen Körpergewichtes, sowie der in der Packungsbeilage angegebenen durchschnittlichen Förderrate und des durchschnittlichen Füllvolumens der Pumpen das Mischverhältnis von Medikament und sterilem Wasser bestimmt werden. Hierzu dient eine speziell konfigurierte Excel-Tabelle (Version 2002, Microsoft, Redmond, WA, USA), welche als *Tabelle 2* auf der folgenden Seite exemplarisch aufgeführt ist.

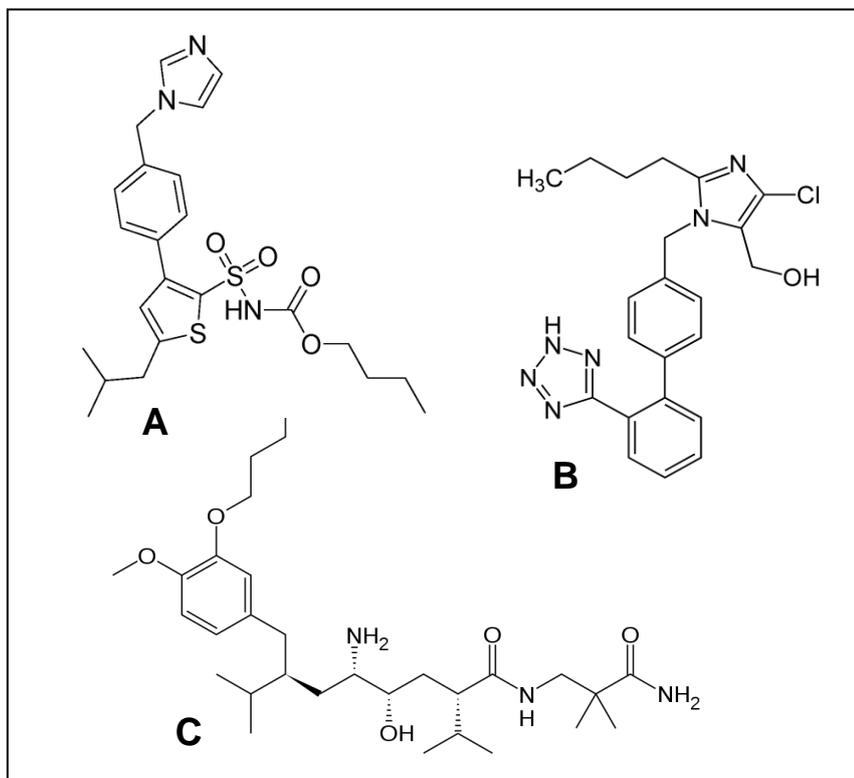


Abb. 6: Strukturformeln der verwendeten Medikamente:
A: AT₂-Agonist Compound 21 (Quelle: [12]),
B: AT₁-Antagonist Losartan (Quelle: wikipedia),
C: Renin-Inhibitor Aliskiren (Quelle: wikipedia).

Tabelle 2: Berechnung von Ansatzmenge und Konzentration für mikro-osmotische Pumpen; exemplarisch für 4 durchschnittlich je 28,0 g schwere Mäuse und eine Therapiedosis von 50 mg Aliskiren/kg KG

FD	angestrebte Förderdosis in [mg Aliskiren/kg*Tag]	50
FD'	Förderdosis in [ng Aliskiren/g*min] $FD' = (FD \cdot 1000) : 24 : 60$	34,72
FV	Fördervolumen in [μ l/h] <i>siehe Beipackzettel</i>	0,22
FV'	Fördervolumen in [μ l/min] $FV' = FV : 60$	0,0037
V	Volumen der Pumpen in [μ l] <i>siehe Beipackzettel</i>	99
V'	benötigtes Volumen in [μ l] inkl. 21 μ l Verwurf	120
A	Anzahl der Mäuse	4
KG	durchschnittliches Körpergewicht der Mäuse in [g]	28,0
K	Konzentration der Förderlösung [ng/ μ l] $K = (FD' \cdot KG) : V'$	265152
M	benötigte Menge Aliskiren in [mg] pro Tier $M = V' \cdot K \cdot 1\,000\,000$	31,66
Gesamtmenge des sterilen Wassers in [μl] = $A \cdot V'$		480
Gesamtmenge des Aliskiren in [mg] = $A \cdot M$		127,27

Die mikro-osmotischen Pumpen werden am Abend vor der Implantation unter sterilen Bedingungen unter der Arbeitsbank im Zellkulturlabor mit der beiliegenden Kanüle befüllt, mithilfe von zwei gründlich desinfizierten Pinzetten zusammengebaut und über Nacht in isotone, 0,9%ige NaCl-Lösung (B.Braun, Melsungen, Deutschland) gelegt.

3.2.10 Verwendete Chemikalien

Die nicht näher bezeichneten Chemikalien wurden von Merck (Darmstadt, D), Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) und Th.Geyer (Hamburg, D) bezogen.

3.3 Operative Verfahren und Organentnahme

3.3.1 Allgemeine OP-Vorbereitung

Zur Narkoseeinleitung wird die Narkosekammer vom Vapor 2000 (Dräger, Lübeck, Deutschland) mit 3,5 % Isofluran (Baxter, Unterschleißheim, Deutschland) geflutet. Als Trägergas dient medizinischer Sauerstoff. Die narkotisierte Maus wird gewogen, rasiert und auf einer 38 °C warmen Heizplatte für den operativen Eingriff fixiert. Die Narkose wird durch einen Schnautzenaufsatz aufrechterhalten. Die Tiefe der Narkose wird mittels Zwischenzehenreflex überprüft. Die Analgesie erfolgt mit Tramal (100 mg Tramadol-hydrochlorid je 2 ml Ampulle; Grünenthal, Aachen, Deutschland), welches im Verhältnis 1:20 mit isotoner NaCl-Lösung verdünnt wird. Jeder Maus wird 1 ml dieser Verdünnung subkutan in eine Nackenfalte injiziert.

Postoperativ erfolgt die Gabe von 16 Tropfen Novalminsulfon-ratiopharm (500 mg Metamizol-Natrium 1 H₂O/ml; 1 ml ~ 20 Tropfen) ad 300 ml Trinkwasser.

3.3.2 Implantation mikro-osmotischer Pumpen

Die OP-Vorbereitung erfolgt nach dem unter 3.3.1 aufgeführten Schema. Nach der Rasur des Nackens wird dieser mit Cutasept G (Propan-2-ol 63,0 g; Bode Chemie, Hamburg, Deutschland) desinfiziert. Es folgt ein 1-2 cm langer transversaler Schnitt zwischen den Schulterblättern. Unter stumpfer Präparation wird eine subkutane Tasche präpariert, in die die Pumpe unter möglichst sterilen Bedingungen implantiert wird. Anschließend erfolgt der Wundverschluss mit einer Metallklammer.

3.3.3 Unilaterale Ureterobstruktion (UUO)

Die OP-Vorbereitung erfolgt nach dem unter 3.3.1 aufgeführten Schema. Von der narkotisierten Maus wird das Körpergewicht bestimmt und die rechte Flanke mit einem handelsüblichen Rasierer rasiert. Anschließend wird die Maus linksseitig auf einer 38 °C warmen Heizplatte fixiert und weiterhin durch einen Schnautzenaufsatz gleichmäßig narkotisiert.

Nach der Desinfektion der rasierten Flanke mit Cutasept G erfolgt ein lateraler Flankenschnitt. Der Ureter wird vorsichtig freipräpariert, mit einer Pinzette vom Fettgewebe gelöst und mit zwei polyphilen, nicht resorbierbaren 2-0er Fäden abgebunden. Der Schnitt wird anschließend

mit einem polyphilen, nicht resorbierbaren 4-0er Faden subkutan genäht. Zusätzlich erfolgt eine Klammernaht mit 3-4 Metallklammern. Die Mäuse erwachen im angewärmten Käfig unter Beobachtung aus der Narkose.

3.3.4 Organentnahme

Die OP-Vorbereitung erfolgt nach dem unter 3.3.1 aufgeführten Schema. Die narkotisierte Maus wird gewogen, rüklings auf einer 38 °C warmen Heizplatte fixiert und weiterhin durch einen Schnautzenaufsatz gleichmäßig narkotisiert. Nach einem medianen, pararektalen Bauchdeckenschnitt wird der Thorax mit einer Schere eröffnet. Zur Blutentnahme wird die rechte, noch pumpende Herzkammer durch das Diaphragma mit einer zuvor heparinisierten 1 ml-Spritze punktiert. Das Blut wird direkt in ein Eppi gefüllt und auf Eis gekühlt. Die Nieren werden freipräpariert und entnommen. Nach Entfernung der Nierenkapsel wird das jeweilige Gewicht bestimmt. Auf Höhe des Nierenhilus wird eine circa 0,2 cm dicke Scheibe mit einem Skalpell herausgeschnitten und für die histologische Auswertung über 24 Stunden in jeweils 4 ml 4%igem Formalin bei 4 °C im Kühlschrank fixiert. Das restliche Nierengewebe wird in einem sterilen Eppi auf Eis gekühlt. Die narkotisierte Maus wird durch Genickbruch getötet. Im Labor wird das Blut 10 Minuten lang bei 3500 rpm und 4 °C zentrifugiert (Centrifuge 5417R; Eppendorf, Hamburg, Deutschland). Das entstandene Plasma wird abpipettiert und bei -20 °C weggefroren. Mit einem sterilen Skalpell wird der Kortex des gekühlten Nierengewebes vom Nierenmark separiert. Dies geschieht in sterilen, auf Eis gekühlten Petrischalen, um eine Kontamination mit RNasen oder Fremd-RNA zu vermeiden. Der Kortex wird in einem Schraubepi in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C weggefroren.

3.3.5 Gewinnung und Analyse von Plasma

Die nach der Organentnahme bei -20 °C weggefrorenen Plasmaproben werden bei Raumtemperatur schonend aufgetaut und 10 Minuten lang bei 3500 rpm und 4 °C zentrifugiert. Im Zentrallabor werden Kreatinin und Harnstoff-N aus jeweils 150 µl Plasma mit einem Autoanalyzer (Hitachi 717; Roche, Mannheim, Deutschland) bestimmt.

3.3.6 Bestimmung der Plasmaspiegel

Die Compound 21- Plasmaspiegel wurden in der Pharmakologie des UKEs von Dr. med. Edzard Schwedhelm aus jeweils 150 µl Plasma bestimmt. Dies geschieht nach dem Protokoll der oralen Absorptionsstudie von Compound 21 von Wan Y et al., deren Ergebnisse unter dem Titel „Design, Synthesis, and Biological Evaluation of the First Selective Nonpeptide AT₂ Receptor Agonist“ 2004 im „Journal of Medicinal Chemistry (47): 5995-6008“ [12] veröffentlicht wurden. Die Plasmaspiegel werden durch LC-MS/MS analysiert. Hierzu werden eine Mikropumpe und ein Autoanalyser (beide: Serie 200; Perkin-Elmer, Beaconsfield, UK) an die „Turbo IonSpray“ Quelle eines Triple-Quadrupol-Massenspektrometers (API 365; Applied Biosystems, Warrington, UK) gekoppelt [12].

3.3.7 Bestimmung der Angiotensin I-Plasmaspiegel

Das bei -20 °C weggefrorene Plasma wurde auf Trockeneis zu PhD Jan Danser in die pharmakologische Abteilung in Rotterdam geschickt. Die Angiotensin I-Plasmaspiegel wurden nach dortigem, standardisiertem Protokoll bestimmt.

3.4 Genexpression

3.4.1 RNA-Isolation

Das im Kühlschrank bei 4 °C gelagerte TRIZOL (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) wird auf Raumtemperatur equilibriert. Zunächst werden unter dem Abzug pro Probe jeweils 500 µl TRIZOL in zuvor beschriftete Eppis vorgelegt. Die zu bestimmenden Gewebeproben befinden sich in Schraubepphis bei -80 °C im Gefrierschrank und werden in einer mit Trockeneis gefüllten Styroporbox ins Labor überführt. Mittels desinfizierter Pinzette und eines sterilen Skalpells wird auf einer sterilen Petrischale ein kleines Gewebestück entnommen und in das mit 500 µl TRIZOL gefüllte Eppi gegeben. Pinzette und Skalpell werden mit 70%igem Ethanol desinfiziert. Die Petrischale wird durch eine neue sterile ersetzt. Das Restgewebe wird auf dem Trockeneis gekühlt und letztlich erneut bei -80 °C weggefroren. Nun wird das Gewebe in dem TRIZOL möglichst gleichmäßig lysiert.

Hierzu wird je Eppi eine Wolframcarbid-Kugel (3mm, #69997; Qiagen N.V., Venlo, Niederlande) mit einer desinfizierten Pinzette hinzugegeben. Diese lysiert das Gewebe bei zweimaliger „Rüttlung“ im TissueLyser von Qiagen (jeweils 1 Minute bei 300/min) sehr gleichmäßig. Um die Proteine ausfällen zu lassen, werden jeweils 100 µl Chloroform hinzupipettiert. Nachdem die Eppis geschüttelt wurden, werden sie 15 Minuten lang bei 4 °C und 10 000 g zentrifugiert (Centrifuge 5417R; Eppendorf, Hamburg, Deutschland). Die nun entstandene obere wässrige Phase, die die von Protein befreite RNA enthält, wird unter Vermeidung der Interphase in ein neues Eppi überführt. Inter- und untere Phase werden im Phenol-Abfall entsorgt. Nun wird die RNA von weiteren Stoffen separiert. Da RNA in Isopropanol nicht lösbar ist und nach Zentrifugation am Boden des Eppis aggregiert, werden 200 µl Isopropanol zu der zuvor separierten oberen Phase hinzugefügt. Die Eppis werden geschüttelt und 30 Minuten lang bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Ende der Inkubationszeit werden die Eppis 10 Minuten lang bei 4 °C und 10 000 g zentrifugiert. Der Überstand wird mit der 200 µl-Pipette (PIPETMAN, Gilson, Middleton, WI, USA) vorsichtig entfernt und im GIT-Abfall entsorgt. Das zurückgebliebene RNA-Pellet wird in 500 µl eiskaltem, 80%igem Ethanol resuspendiert und auf Eis gekühlt. Um sämtliche Isopropanol-Rückstände auszuwaschen erfolgt erneut eine 10-minütige Zentrifugation bei 4 °C und 10 000 g. Die Überstände werden im GIT-Abfall entsorgt. Das Pellet wird erneut in 500 µl des eiskalten Ethanol resuspendiert. Dieser Waschschrift wird ein weiteres Mal durchgeführt. Die mit Ethanol resuspendierten Pellets werden dieses Mal 10 Minuten lang in der 4 °C kalten Zentrifuge bei Fullspeed zentrifugiert, damit die Pellets möglichst fest am Boden des Eppis aggregieren. Die Überstände werden wie zuvor entsorgt. Nachdem möglichst viel Ethanol ohne Verlust des Pellets abpipettiert wurde, erfolgt die Trocknung der Pellets für etwa 5 Minuten in der SpeedVac (DNA 110; Savant, Osterville, MA, USA). Zur erneuten Resuspendierung des getrockneten RNA-Pellets wird RNase out (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) mit RNase-freiem Wasser im Verhältnis 1:100 gemischt. Jedes Pellet wird in jeweils 25 µl dieser Lösung resuspendiert und anschließend eine Stunde lang auf Eis gekühlt.

3.4.2 Konzentrationsbestimmung der RNA

Für die Konzentrationsbestimmung mit dem UV Spektrometer Gene Quant pro (Amersham Pharmacia Biotech, Wien, Österreich) werden 100 µl benötigt. Die isolierte RNA wird im Verhältnis 1:20 mit RNase freiem Wasser gemischt. Die Bestimmung der RNA-Konzentration erfolgt photometrisch bei 230 nm und einer Schichtdicke von 10 mm. Das Ergebnis trägt die Einheit µg/µl. Um Verunreinigungen zu vermeiden, wird die Küvette nach jeder Probe sorgfältig mit destilliertem Wasser gespült.

3.4.3 cDNA-Synthese

Anhand der photometrischen Konzentrationsbestimmung wird die auf Eis gekühlte RNA zunächst mit RNase freiem Wasser jeweils auf eine Konzentration von 100 ng/µl gebracht. Dann werden Mastermix I und II für die Anzahl der Proben + 2 Reserven angesetzt (*siehe Tabelle 3*). Die synthetisierte cDNA reicht für 5 Primer sowie 18S als Housekeeping-Gen und kann bei Bedarf auch doppelt angesetzt werden.

Tabelle 3: Rezept für Mastermix I und II pro Probe (einfacher Ansatz)

Mastermix I	Mastermix II
8 µl RNase freies Wasser (Aqua, B.Braun, Melsungen, Deutschland)	4 µl 5 x First strand buffer (28025-013; Invitrogen)
1 µl Random Hexamer primer (100 ng /µl) (300 µg, 3 µg/µl, 48190-011; Invitrogen)	2 µl 0,1 M DTT (28025-013; Invitrogen)
1 µl dNTP-Mix (10 mM) (100 mM dNTP set, 10297-018; Invitrogen)	1 µl RNase out (40 U/µl) (10777-019; Invitrogen)
	1 µl MLV-RT (28025-013; Invitrogen)

Zunächst werden in 500 µl-Eppis jeweils 10 µl gevortexter Mastermix I vorgelegt. Anschließend werden jeweils 2 µl der zu analysierenden, auf Eis gekühlten und zuvor kurz gevortexten RNA hinzupipettiert. Die Eppis werden 1-2 Sekunden (s) lang bei mittlerer Geschwindigkeit gevortext und 5 s lang mit einer Tischzentrifuge (Centrifuge 5415D; Eppendorf, Hamburg, Deutschland) runterzentrifugiert. Danach erfolgt die Denaturierung 5 Minuten lang bei 65 °C in der PCR-Maschine (T-Gradient; Biometra, Göttingen, Deutschland).

Anschließend werden die Eppis 5 Minuten lang auf Eis gekühlt. Dann werden jeweils 10 µl Mastermix II hinzupipettiert. Nach erneutem Vortexen und Runterzentrifugieren erfolgt die cDNA-Synthese in der PCR-Maschine nach folgendem Programm: 50 min 37 °C; 15 min 70 °C; Pause 4 °C. Die fertig synthetisierte cDNA wird bis zur Durchführung der Realtime RT PCR bei 4 °C im Kühlschrank gelagert und kann danach bei -20 °C weggefroren werden.

3.4.4 Realtime RT-PCR

Bei der relativen Quantifizierung wird die Expression des Zielgens auf die des Referenzgens bezogen. Als Referenzgen, auch Housekeeping-Gen genannt, dient häufig 18S ribosomale RNA (18S rRNA), da sie konstitutiv exprimiert und nicht reguliert wird. Zunächst wird ein Belegungsplan für die 96 Loch-Platte erstellt, welcher anschließend auch in das Programm der Realtime RT-PCR-Maschine (StepOnePlus Real-Time PCR System; Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) übertragen wird.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1	1	2	2	3	3	4	4	5	5	6	6
B	7	7	8	8	9	9	10	10	11	11	12	12
C	13	13	14	14	15	15	16	16			neg	neg
D												
E	1	1	2	2	3	3	4	4	5	5	6	6
F	7	7	8	8	9	9	10	10	11	11	12	12
G	13	13	14	14	15	15	16	16			neg	neg
H												

} 1. Primer
(18S)

} 2. Primer

Abb. 7: Exemplarischer Belegungsplan für 96 Loch-Platte.

Anschließend wird für jeden Primer gemäß *Tabelle 4* ein Mastermix angesetzt. Da je Probe eine Doppelbestimmung und je Primer eine doppelte Negativkontrolle erforderlich ist und zudem 4 Reservelöcher eingeplant werden sollten, gilt folgende Formel für die Berechnung: (Anzahl der Proben) · 2 + 2 Negativkontrollen (neg) + 4 Reserven.

**Tabelle 4: Mastermix-Rezept
je Loch**

Mastermix
6,25 µl SYBR Green (11733-046; Invitrogen)
1,25 µl Fw Primer 1 µM 1,25 µl Rev Primer 1 µM (Invitrogen; (siehe 2.4.5))
0,25 µl ROX (11733-046; Invitrogen)
2,00 µl steriles Wasser (Aqua; B.Braun)

Die Primer wurden im Labor designed und von Invitrogen (Carlsbad, CA, USA) hergestellt. Nach dem Lösen der gelieferten Trockensubstanz wird der jeweilige Primer in einer Konzentration von 1 mM aliquotiert und bei -20 °C gelagert. Die Primer werden vor Gebrauch durch eine 1:100-Verdünnung mit sterilem Wasser auf eine Konzentration von 1 µM gebracht und können bei 4 °C gelagert werden.

Tabelle 5: Liste der verwendeten Primersequenzen

<i>Name</i>	<i>Vorwärts (Fw)</i>	<i>Rückwärts (Rev)</i>
<i>18S-rRNA</i>	CAC GGC CGG TAC AGT GAA AC	AGA GGA GCG AGC GAC CAA A
<i>Fibronektin</i>	GCC GTC ATT TTC TGC CTC AT	GAG AGC TTC CTG TCC TGT AGA G
<i>IP-10</i>	GCC GTC ATT TTC TGC CTC AT	TGC AGC GGA CCG TCC TT
<i>MCP-1</i>	GGC TCA GCC AGA TGC AGT TAA	CCT ACT CAT TGG GAT CAT CTT GCT
<i>PAI-1</i>	GGA CAC CCT CAG CAT GTT CA	TCT GAT GAG TTC AGC ATC CAA GAT
<i>Renin</i>	GCT CTG GAG TCC TTG CAC CTT	CTT GAG CGG GAT TCG TTC AA

Nach dem Belegungsplan werden je Loch jeweils 11 µl Mastermix vorgelegt. Anschließend werden jeweils 1,5 µl der zugehörigen, auf Eis gekühlten cDNA (bzw. 1,5 µl steriles Wasser für die Negativkontrollen) hinzupipettiert, so dass sich letztlich 12,5 µl in jedem Loch befinden.

Für die Bestimmung der relativen mRNA-Expression der rRNA 18S ist eine 1:500-Verdünnung der cDNA notwendig, von der ebenfalls 1,5 µl je Loch zum vorgelegten Mastermix hinzupipettiert werden. Am Ende wird die 96 Loch-Platte mit einer Folie beklebt und nach 1-minütiger Zentrifugation bei 1000 rpm (Thermo Scientific Multifuge 1 S-R; Heraeus, Hanau, Deutschland) in die Realtime PCR-Maschine gelegt. Das zuvor gespeicherte Programm wird nun gestartet.

Die Messung dauert bei folgendem Protokoll etwa 2,5 Stunden:

Phase 1: 10 min bei 95 °C

Phase 2: 40 Zyklen à 15 Sekunden (s) bei 95 °C und 1 min bei 60 °C

Phase 3: Bestimmung der Schmelzkurven.

15 s bei 95 °C, 1 min bei 60 °C und 15 s bei 95 °C

3.4.5 Auswertung der Realtime RT-PCR

Differiert die Doppelbestimmung um mehr als einen Zyklus, ist eine erneute Bestimmung erforderlich. Zunächst bildet man den Mittelwert der doppelt bestimmten CT-Werte. Subtrahiert man den Mittelwert des zu bestimmenden Gens von dem 18S-rRNA-Mittelwert, so erhält man den Δ CT-Wert. Subtrahiert man nun von dem Mittelwert der Δ CT-Werte der Kontrollmäuse jeweils den Δ CT-Wert der anderen Versuchstiere, so erhält man den so genannten $\Delta\Delta$ CT-Wert. Potenziert man nun die Zahl 2 mit dem $\Delta\Delta$ CT-Wert ($2^{\Delta\Delta CT}$), so erhält man die relative Expression des zu bestimmenden Gens für die jeweilige Probe.

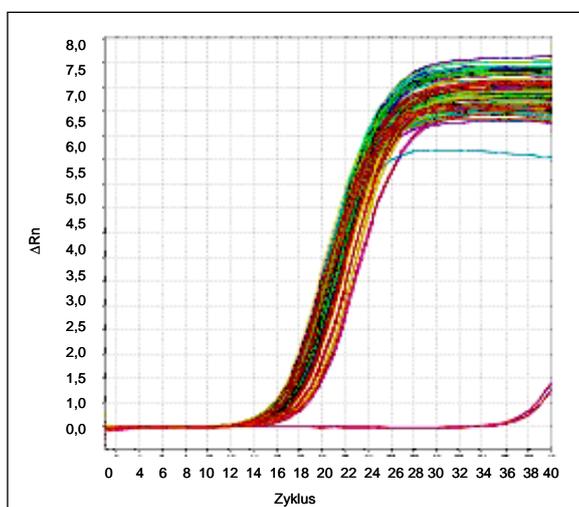


Abb. 8: Amplifikations-Graphen.

3.5 Histologie

3.5.1 Fixierung des Nierengewebes

Sörensen-Phosphat-Puffer (pH 7,4) wird durch das Lösen von 3,0290 g Natriumhydrogenphosphat-1-hydrat und 14,1365 g Natriumhydrogenphosphat-2-hydrat in 1000 ml destilliertem Wasser hergestellt und ist im Kühlschrank mehrere Wochen haltbar. Am Tag der Organentnahme wird durch eine 1:8-Verdünnung von 37%iger Formaldehydlösung (Merck, Darmstadt, Deutschland) mit Sörensen-Phosphat-Puffer eine 4%ige Formalinlösung frisch angesetzt. Die bei der Organentnahme entnommene circa 0,2 cm dicke Nierenscheibe wird über 24 Stunden in jeweils 4 ml des 4%igen Formalins bei 4 °C im Kühlschrank fixiert. Nach der 24-stündigen Fixierung werden die Nierenscheiben 3 x 30 Minuten lang mit je 5 ml „Phosphate-Buffered Saline“ (PBS) (Lonza, Basel, Schweiz) bei Raumtemperatur gewaschen. Um die Diffusion des Formalins aus dem Gewebe zu beschleunigen werden die Röhrchen dabei auf einer Wippe (Heidolph Polymax 1040; Heidolph Instruments, Schwabach, Deutschland) kontinuierlich bewegt. Nach dem dritten Waschschrift wird das PBS erneut verworfen. Die Nierenscheiben werden mit 5 ml frischem PBS erneut komplett bedeckt und bis zur Einbettung im Kühlschrank der Histologie aufbewahrt.

3.5.2 Einbettung des Nierengewebes

Um das Nierengewebe mit Paraffin durchtränken zu können, muss es zuvor in Xylol getaucht werden. Da Xylol jedoch nicht wasserlöslich ist, müssen die fixierten Nierenscheiben zunächst unter Verwendung einer Alkoholreihe dehydriert werden. Nach initialem Einweichen in 50%-igem Ethanol (EtOH) für 2 Stunden erfolgen die weiteren Schritte nach folgendem Schema über Nacht in der Citadel 1000 (Shandon, Frankfurt, Deutschland).

Ethanolreihe:	Zeit [h]:	2,5	1	1	1	1,5	1	1	1,5
	EtOH [%]:	60	70	96	96	96	100	100	100

Danach wird das Gewebe für 2 x 1 Stunde und 1 x 1,5 Stunden in Xylol getaucht und anschließend für 1 und 1,5 Stunden mit warmem, flüssigen Paraffin (Paraplast PLUS; Klinika medical, Usingen, Deutschland) durchtränkt. Es wird in Blöcke gegossen (Tissue-Tek; Sakura, Torrance, CA, USA) abgekühlt, aus den Förmchen herausgebrochen und von überstehendem Paraffin befreit.

3.5.3 Schneiden der Paraffinblöcke

Die eingebetteten Nieren werden mit dem Mikrotom (RM 2255, Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland) in 1,5 µm dünne Scheiben geschnitten und auf Objektträger überführt.

3.5.4 Backen der Schnitte

Die Objektträger werden in ein Bänkchen gestellt und über Nacht bei 40 °C im Ofen gebacken.

3.5.5 Deparaffinierung

Um die fertig gebackenen Schnitte vom Paraffin zu befreien werden sie mit ihren Bänkchen jeweils 5 Minuten lang in folgenden Flüssigkeiten gebadet: dreimal in Xylol und jeweils zweimal in 100%igem, 96%igem und 75%igem Ethanol. Abschließend werden die Schnitte zweimal für je 5 Minuten in Aqua dest. gewaschen. (Bei immunhistochemischen Färbungen erfolgt eine Umrandung mit einem Pap Pen (Roche, Mannheim, Deutschland) und eine dreimal 10-minütige Inkubation in PBS.)

3.5.6 PAS-Färbung

Folgende Lösungen müssen 3 Tage vor der Färbung für die Hämaun-Färbung nach Böhmer angesetzt und über Nacht gelöst werden:

Lösung 1: 200 ml Aqua bidest. + 10 g Aluminiumkaliumsulfat x 12 H₂O

Lösung 2: 1,0 g Hämatoxylin (SERVA, Heidelberg, Deutschland) + 10 g Ethanol

Zunächst werden die Schnitte 15 Minuten lang in 1%ige Perjodsäure (Merck, Darmstadt, Deutschland) (1 g ad 100 ml Aqua dest.) getaucht, anschließend 2-3 Minuten unter fließendes Leitungswasser gestellt und mit Aqua dest. gespült. Dann folgt eine 50-minütige Inkubationszeit mit Schiff'scher Reagenz (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Nachdem die Objektträger in ihrem Bänkchen 7-10 Minuten lang unter warmes, fließendes Leitungswasser gestellt wurden, werden sie erneut mit Aqua dest. gespült. Nun erfolgt die Kernfärbung mit Hämaun nach Böhmer. Hierzu werden die am Vortag angesetzten Lösungen (*siehe oben*) gemischt und für 1 Minute auf die Schnitte pipettiert. Anschließend werden die Schnitte in ihren Bänkchen 2 x 2 Minuten lang unter

fließendem Leitungswasser gespült. Die Differenzierung der Schnitte erfolgt in HCL-Ethanol (auf 100 ml 80%igen EtOH kommt 1 ml 25N HCl) bis keine Farbwolken mehr entstehen. Nach erneutem Spülen mit Leitungswasser erfolgt eine mikroskopische Kontrolle der PAS-Färbung. Um die Schnitte zu dehydrieren erfolgt eine aufsteigende Alkoholreihe: 2 min 70%iger, 2 min 96%iger, 2 x 2 min 100%iger, 5 min 100%iger und 10 min 100%iger Ethanol; dann 3 x 5 min Xylol. Erst jetzt können die Schnitte mit Eukitt (O.Kindler, Freiburg, Deutschland) und Deckgläschen eingedeckelt und bei Raumtemperatur getrocknet werden.

3.5.7 Messung des prozentualen Interstitiumanteils

Mit der an ein Mikroskop (Zeiss Axioskop; Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland) angeschlossenen Kamera (Zeiss Axio Cam HRc; AxioVision 3.1) werden je Niere 5 digitale Fotos des PAS-gefärbten Nierenkortex erstellt und gespeichert. Die Auswertung der Bilder erfolgt mit PowerPoint (Version 2002, Microsoft, Redmond, WA, USA) am Computer. Durch das Auflegen eines Punktrasters mit 5 x 8 Punkten wird der prozentuale Anteil von Tubulusepithel, -lumen, Interstitium und Glomeruli ermittelt.

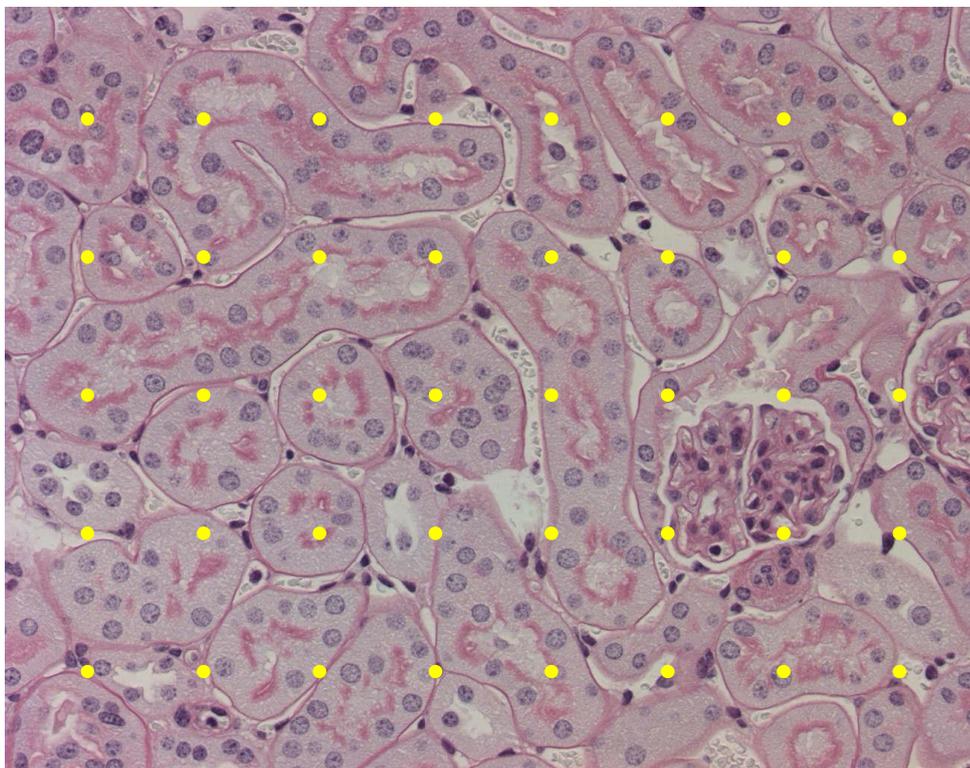


Abb. 9: Messung des prozentualen Interstitiumanteils am Beispiel einer scheinoperierten Maus.

3.5.8 CD3-Färbung

Das Ziel dieser Färbung ist die Darstellung von CD3-positiven T-Zellen. Als Positivkontrolle dient Mausmilz.

Ebenso wie bei der PAS-Färbung müssen auch hier die Lösungen für die Hämalan-Färbung 3 Tage vorher wie unter 3.5.8 angesetzt werden.

Am Tag der Färbung wird Neufuchsin nach folgendem Rezept angesetzt:

- in einem 15 ml Falcontube: 7,5 ml Aqua dest. + 300 mg Natriumnitrit,
+ 300 µl Neufuchsinstammlösung (4 °C).

- im Becherglas: Falcontube-Inhalt + 800 µl (1) + 150 ml (2).

(1) 250 mg Naphtol-As-Bi Phosphat + 9,375 g NN-Dimethylformamid

(2) TNT-Puffer (pH 8,2-8,4):

9 g NaCl + 6,35 g TRIS + 1 l H₂O + 1 ml Tween 20 + 25 ml 1N HCL

Das Bänkchen mit den deparaffinierten Schnitten wird in einen Plastikmessbecher gestellt, welcher mit einem Liter Citratpuffer (pH 6,1) gefüllt ist. Dieser Plastikmessbecher wird erst 35 Minuten lang bei 680 Watt in der Mikrowelle erhitzt und dann 10 Minuten lang auf Eiswasser gekühlt. Anschließend werden die Schnitte 3 x 5 Minuten lang mit Leitungswasser gewaschen. Nun folgt die Umrandung mit dem so genannten Pap Pen. Die Objektträger werden in einer feuchten Kammer 3 x 5 Minuten lang mit PBS gewaschen. Um unspezifische Bindungen zu blockieren, wird zunächst normales, 1:20 mit PBS verdünntes goat-Serum (S1000; Linaris, Wertheim, Deutschland) bei Raumtemperatur für 30 Minuten auf die Schnitte pipettiert. Der Primärantikörper (Rabbit polyclonal anti-Mouse CD 3 (Dako GmbH, Hamburg, Deutschland)) wird mit normalem goat-Serum (1:20 mit PBS) im Verhältnis 1:250 verdünnt. Die Inkubation der Schnitte erfolgt über Nacht bei 4 °C. Am Folgetag wird der Sekundärantikörper (Biotinylated goat anti-rabbit IgG (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA)) mit normalem goat-Serum (1:20 mit PBS) im Verhältnis 1:200 verdünnt. Nach dreimaligem Waschen für jeweils 10 Minuten mit PBS erfolgt die Inkubation der Schnitte mit dem Sekundärantikörper für 30 Minuten bei Raumtemperatur. 10 Minuten vor Ablauf der Inkubationszeit wird die Streptavidin-Alkalische Phosphatase (Vectastain ABC-kit; Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) vorbereitet. Hierzu werden Substanz A und Substanz B

jeweils im Verhältnis 1:100 mit PBS verdünnt, gemischt und 30 Minuten lang auf Raumtemperatur equilibriert. Nachdem die Schnitte 3 x 5 Minuten lang mit PBS gewaschen wurden, wird die Streptavidin-Alkalischen Phosphatase für 30 Minuten bei Raumtemperatur auf die Schnitte pipettiert. Nach erneutem Waschen mit PBS beginnt die Farbentwicklung mit dem zu Beginn angesetzten Neufuchsin im Dunkeln unter gelegentlicher mikroskopischer Kontrolle. Die Dauer beträgt 30-40 Minuten. Die Farbentwicklung wird durch zweimaliges Waschen mit destilliertem Wasser für je 5 Minuten gestoppt.

Dann erfolgt die Kernfärbung mit Hämalaun nach Böhmer für 1 Minute. Hierzu werden die am Vortag angesetzten Lösungen (*siehe 3.5.8*) gemischt und auf die Schnitte pipettiert. Anschließend werden die Schnitte in ihrem Bänkchen 2 x 2 Minuten lang unter fließendem Leitungswasser gespült. Die Differenzierung der Schnitte erfolgt in HCL-Ethanol (auf 100 ml 80%igen EtOH kommt 1 ml 25N HCl) bis keine Farbwolken mehr entstehen. Nach erneutem Spülen mit Leitungswasser werden die Schnitte mit Gummiarabicum (Fluka, Milwaukee, WI, USA) und Deckgläschen eingedeckelt und bei Raumtemperatur getrocknet.

Ergebnis:

rot = CD3-Proteinkomplex von CD3-positiven T-Zellen

blau = Zellkerne

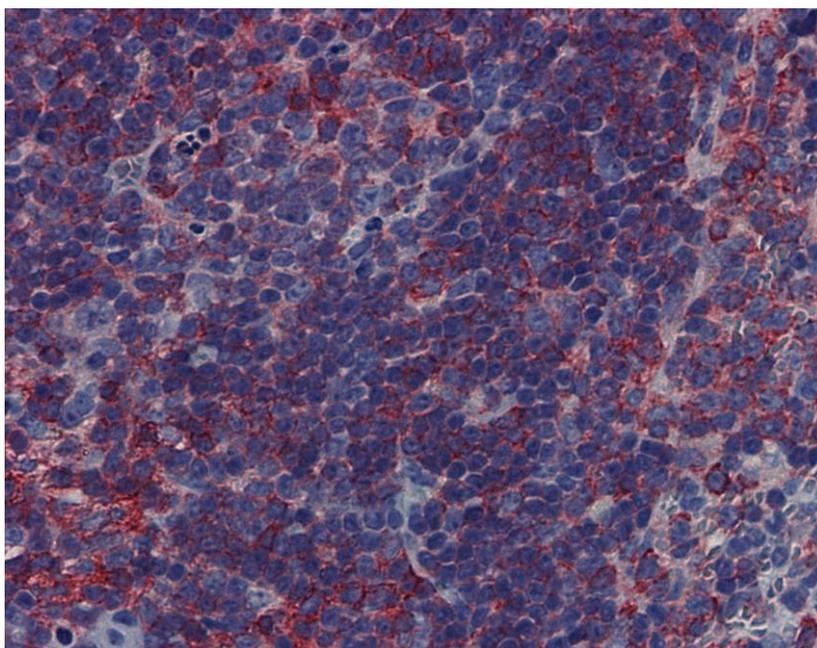


Abb. 10: Positivkontrolle der CD3-Färbung: Mausmilz.

3.5.9 F4/80-Färbung

Ziel dieser Färbung ist die Darstellung des Antigens F4/80 auf murinen Makrophagen. Als Positivkontrolle dient Mausmilz.

Die Lösungen für die Kernfärbung mit Hämalaun und das Neufuchsin werden genauso wie bei der CD3-Färbung angesetzt (*siehe 3.5.8*).

Zunächst erfolgt eine Antigendemaskierung in 0,05%igem Trypsin-EDTA für 15 Minuten bei 37 °C. Anschließend werden die Schnitte in 100%-igem Alkohol von dem Trypsin-EDTA befreit und 3 x 5 Minuten lang in Tris-Buffered Saline (TBS) gewaschen. Um unspezifische Bindungen zu blockieren, wird normales, im Verhältnis 1:20 mit TBS verdünntes horse-Serum (S2000; Linaris, Wertheim, Deutschland) für 30 Minuten auf die Schnitte pipettiert. Der Primärantikörper (rat-anti-mouse F4/80 (AbD Serotec, Kidlington, UK)) wird mit normalem horse-Serum (1:20 mit TBS) im Verhältnis 1:300 verdünnt. Die Inkubation erfolgt über Nacht bei Raumtemperatur.

Am Folgetag wird der Sekundärantikörper (Biotinylierter donkey anti-rat IgG (Jackson IR Laboratories, West Grove, PA, USA)) im Verhältnis 1:200 mit TBS verdünnt. Die Schnitte werden zunächst 3 x 5 Minuten lang mit PBS gewaschen. Die Inkubation der Schnitte mit dem zuvor angesetzten Sekundärantikörper erfolgt über 30 Minuten bei Raumtemperatur. Etwa 10 Minuten vor Ablauf der Inkubationszeit wird die Streptavidin-Alkalische Phosphatase (Vectastain ABC-kit; Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) vorbereitet. Hierzu werden Substanz A und Substanz B jeweils im Verhältnis 1:100 mit 5 x TBS verdünnt, gemischt und 30 Minuten lang auf Raumtemperatur equilibriert. Nach Ablauf der Inkubationszeit werden die Schnitte 2 x 5 Minuten lang mit 5 x TBS gewaschen. Anschließend wird die während der vorherigen Inkubationszeit vorbereitete Streptavidin-Alkalische Phosphatase auf die Schnitte pipettiert und für 30 Minuten bei Raumtemperatur belassen. Nach dreimaligem Waschen mit 5 x TBS erfolgen die 30-minütige Farbentwicklung mit Neufuchsin, die 1-minütige Kernfärbung mit Hämalaun nach Böhmer, die Differenzierung der Färbung und das Eindeckeln der Schnitte nach demselben Prinzip wie bei der CD3-Färbung (*siehe 3.5.8*).

Ergebnis:

rot = membranäre und zytoplasmatische Färbung von Makrophagen

blau = Zellkerne

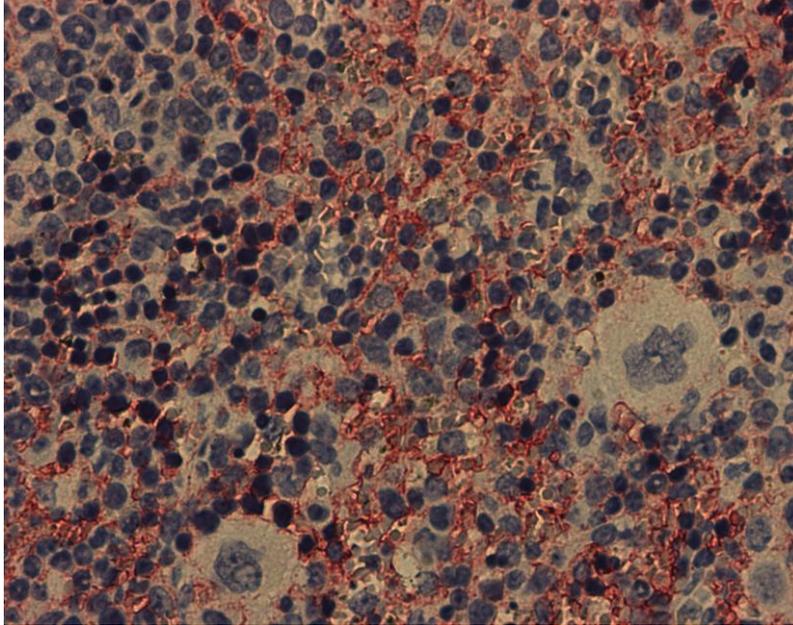


Abb. 11: Positivkontrolle der F4/80-Färbung: Mausmilz.

3.5.10 Auszählung CD3- und F4/80-positiver Zellen

Mit einem Okular (10 x), in welches ein Zählraster (0025 x 0025) eingearbeitet ist, erfolgt die Zählung der CD3- und F4/80-positiven Zellen mit dem 40er Objektiv, in 400-facher Vergrößerung. Je Niere werden 20 Raster meanderförmig im Nierenkortex ausgezählt.

3.5.11 Renin-Färbung

Die deparaffinierten Schnitte wurden von PhD Harry van Goor und Anne-Roos Frenay am University Medical Center Groningen nach dortigem, standardisiertem Protokoll gefärbt.

3.6 Statistik

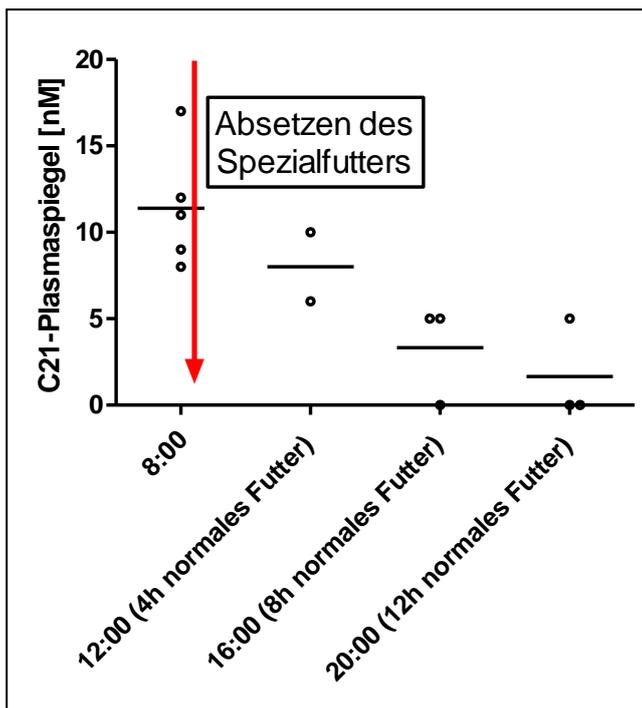
Alle Daten sind als Einzelwerte mit Mittelwert angegeben. Als signifikant wurde ein $p < 0,05$ definiert. Zur graphischen Darstellung und statistischen Auswertung wurde „GraphPad Prism“ (Version 5.00, GraphPad Software, San Diego, CA, USA) verwendet. Die Signifikanzprüfung erfolgte aufgrund der zum Teil geringen n-Zahlen mit dem ungepaarten t-Test.

4. Ergebnisse

4.1 Wahl der Applikationsart

Geht man davon aus, dass Mäuse nachtaktiv sind und nur nachts fressen, so müssten die Plasmaspiegel bei oraler Applikation im Tagesverlauf stetig abnehmen. Um dies nachzustellen, wurde den Mäusen morgens um 8 Uhr das Compound 21-Spezialfutter nach einwöchiger Therapie entzogen. Die Plasmaspiegel des AT₂-Agonisten Compound 21 wurden direkt vor sowie 4, 8 und 12 Stunden nach Absetzen des Spezialfutters bestimmt.

Für diesen Versuch wurde eine Compound 21-Dosis von 10 mg/kg Futter gewählt. Klinisch interessant ist, nach welcher Zeit die Compound 21-Plasmaspiegel auf die Hälfte abgesunken sind. Dabei ist zu beachten, dass es nach Absetzen des Spezialfutters noch zur Resorption des bis 8 Uhr gefressenen Futters aus dem Gastrointestinaltrakt kommt.

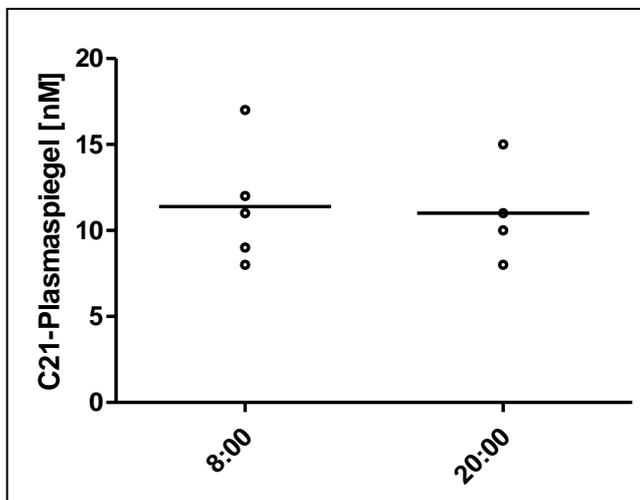


Die Plasmaspiegel des AT₂-Agonisten Compound 21 sind etwa 5 Stunden nach Absetzen des Spezialfutters auf die Hälfte abgesunken.

Abb. 12: Compound 21-Plasmaspiegel in [nM] im Tagesverlauf nach Absetzen des Spezialfutters um 8 Uhr morgens.

Sollten die Mäuse tagsüber tatsächlich kaum oder gar nicht fressen, so wären bei oraler Applikation mit Halbwertszeit der Plasmaspiegel von etwa 5 Stunden keine konstanten Wirkspiegel gewährleistet. Da für die weiteren Versuche jedoch eine 24-Stunden-Wirksamkeit unerlässlich ist,

wurde überprüft ob die Plasmaspiegel nach einwöchiger Therapie ohne Absetzen des Spezialfutters morgens um 8 Uhr und abends um 20 Uhr vergleichbar hoch sind. Für diesen Versuch wurde ebenfalls eine Compound 21-Dosis von 10 mg/kg Futter gewählt.



Die Plasmaspiegel des AT₂-Agonisten Compound 21 betragen sowohl morgens als auch abends durchschnittlich 11 nM.

Abb. 13: Morgendliche und abendliche Compound 21-Plasmaspiegel in [nM].

Dies passt zu der Beobachtung, dass die Mäuse auch tagsüber fressen. Bei oraler Applikation des selektiven AT₂-Agonisten Compound 21 über das Futter sind die Plasmaspiegel folglich über 24 Stunden konstant.

4.2 Unilaterale Ureterobstruktion (UUO)

Die folgenden Daten beruhen auf vier voneinander unabhängig durchgeführten Versuchsdurchgängen mit jeweils 2-3 FVB-Mäusen pro Versuchsgruppe.

Tabelle 6: Gesamtgruppengröße nach vier voneinander unabhängigen Versuchsdurchgängen

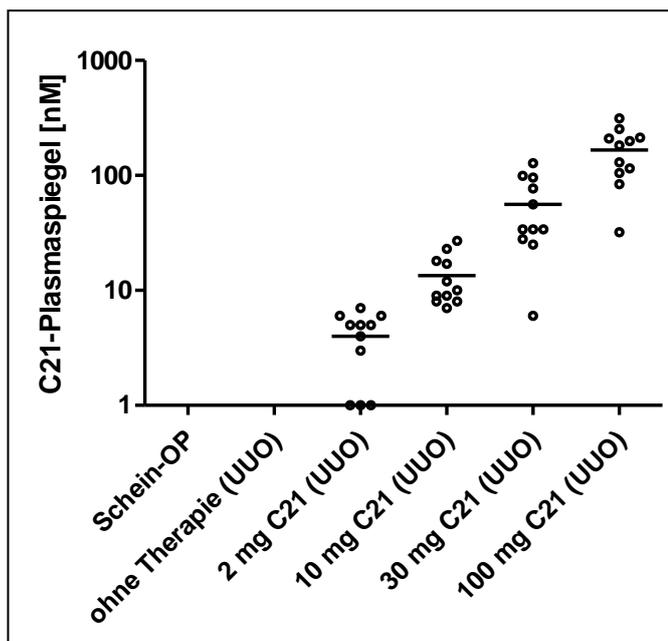
Versuchsgruppe	Anzahl der Mäuse
Schein-OP	6
UUO ohne Therapie	9
UUO unter 2 mg Compound 21/kg Futter	11
UUO unter 10 mg Compound 21/kg Futter	11
UUO unter 30 mg Compound 21/kg Futter	11
UUO unter 100 mg Compound 21/kg Futter	11

Die Mortalität betrug in allen vier Versuchsdurchgängen 0 %.

Lediglich eine Maus musste nachträglich aus der Wertung genommen werden, da die unilaterale Ureterobstruktion nicht erfolgreich war. Bei dieser Maus waren weder makroskopisch noch histologisch Anzeichen eines Harnaufstaus erkennbar. Zudem war weder auf mRNA-Ebene noch histologisch eine UUO-bedingte Inflammation oder Fibrose nachweisbar.

4.2.1 Dosis-Wirkungs-Kurve

Da bislang keine Daten zur oralen Applikation von Compound 21 (C21) bei Mäusen bekannt sind, wurde zunächst eine Dosis-Wirkungskurve erstellt. Die Bestimmung der Plasmaspiegel erfolgte nach zweiwöchiger Therapie.



Mit steigender Dosis des AT_2 -Agonisten C21 steigen die Plasmaspiegel an.

Abb. 14: Dosisabhängige C21-Plasmaspiegel in [nM].

4.2.1.1 Die ideale Dosis

Gemäß pharmakologischen Überlegungen liegt die ideale Dosis eines Medikaments vor, wenn im Serum der 10-fache Wert der Bindungskonstanten K_i vorhanden ist. Der AT_2 -Agonist Compound 21 hat eine K_i von 0,4 nM [12], so dass die C21-Plasmaspiegel idealerweise 4 nM betragen sollten. Somit entspricht eine Dosis von 2 mg C21/kg Futter der idealen Dosis, bei der am ehesten ein Effekt zu erwarten ist.

4.2.2 Körpergewicht

Das Körpergewicht der gleichaltrigen, männlichen FVB-Mäuse wurde am Tag der Randomisierung in die sechs verschiedenen Versuchsgruppen, am Tag der unilateralen Ureterobstruktion und am Tag der Organentnahme zur Verlaufskontrolle bestimmt.

Tabelle 7: Durchschnittliches Körpergewicht (KG) bei Therapiebeginn, bei der unilateralen Ureterobstruktion und bei der Organentnahme in [g] ± SEM

	Therapiebeginn	UUO	Organentnahme
Schein-OP	29,2 ± 0,8	29,8 ± 0,6	30,1 ± 0,6
ohne Therapie	28,8 ± 0,6	29,6 ± 0,8	28,4 ± 0,4
2 mg C 21	28,3 ± 0,3	29,3 ± 0,4	27,7 ± 0,6
10 mg C 21	29,9 ± 1,0	30,7 ± 1,0	28,2 ± 1,3
30 mg C 21	29,1 ± 1,4	28,7 ± 1,9	28,8 ± 1,1
100 mg C 21	29,3 ± 0,7	30,0 ± 0,6	28,7 ± 0,6

4.2.3 Retentionsparameter

Die laborchemische Bestimmung der Retentionsparameter im Plasma ermöglicht lediglich eine Aussage über die Funktion der kontralateralen Niere ohne Ureterobstruktion. Sollten die Kreatinin- und Harnstoff-N-Werte im Modell der unilateralen Ureterobstruktion unter der Therapie mit dem neuen selektiven AT₂-Agonisten Compound 21 signifikant ansteigen, so würde dies auf einen nephrotoxischen Effekt hinweisen.

Da anhand der Retentionsparameter weder die Funktion noch die Regeneration der UUO-Niere beurteilt werden kann, sind lediglich die Kreatinin- und Harnstoff-N-Werte des Hauptversuches und der Positivkontrolle zum Ausschluss einer nephrotoxischen Wirkung der jeweiligen Medikamente aufgeführt.

Die Kreatinin-Bestimmung erfolgt mit dem „Autoanalyzer“ Hitatschi 717 der Firma Roche für humanes Plasma. Kreatininwerte unter der von Roche angegebenen Nachweisgrenze von 0,2 mg/dl können folglich nur als Anhaltspunkt für den wahren Kreatininwert dienen.

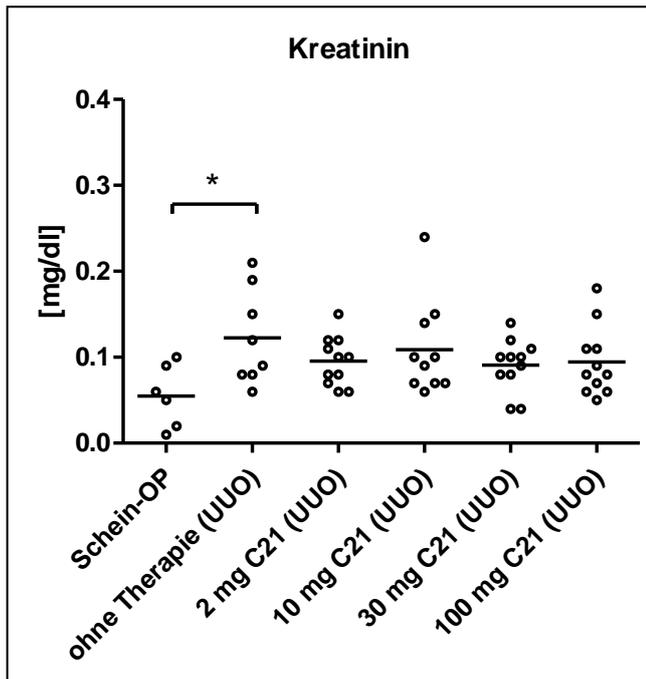


Abb. 15: Plasmakreatinin in [mg/dl], * $p < 0,05$.

Bezogen auf die Gruppe ohne Therapie führt keine der vier Dosen des selektiven AT₂-Agonisten Compound 21 zu einer signifikanten Erhöhung oder Reduktion der Kreatininwerte nach UUO.

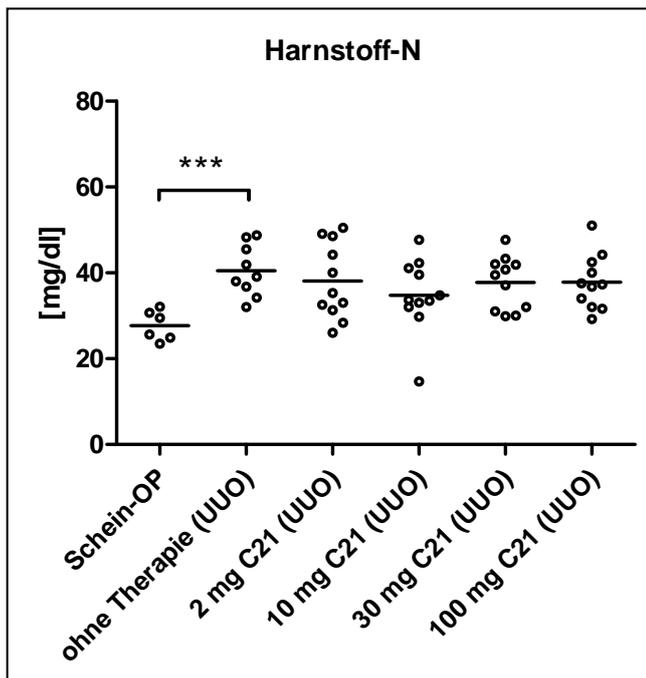


Abb. 16: Plasmaharnstoff-N in [mg/dl], $p < 0,001$.

Bezogen auf die Gruppe ohne Therapie führt keine der vier Dosen des selektiven AT₂-Agonisten Compound 21 zu einer signifikanten Erhöhung oder Reduktion der Harnstoffwerte nach UUO.

4.2.4 Relatives Nierengewicht

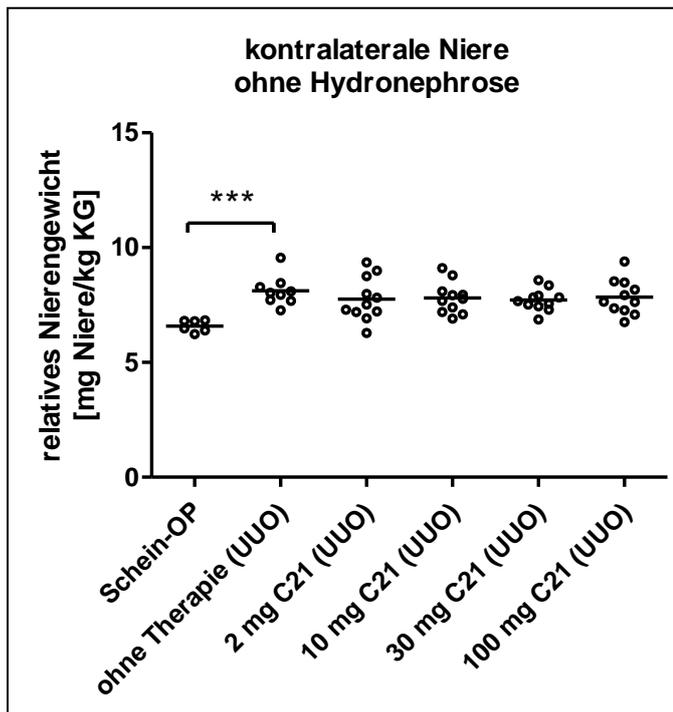


Abb. 17: Gewicht der kontralateralen Niere ohne Hydronephrose bezogen auf das Körpergewicht bei Organentnahme in [mg Niere/kg KG], *** $p < 0,001$.

Nach 7-tägiger UUO ist das relative Gewicht der kontralateralen Niere ohne Hydronephrose signifikant erhöht. Keine der vier C21-Dosen führt zu einer Gewichtsreduktion.

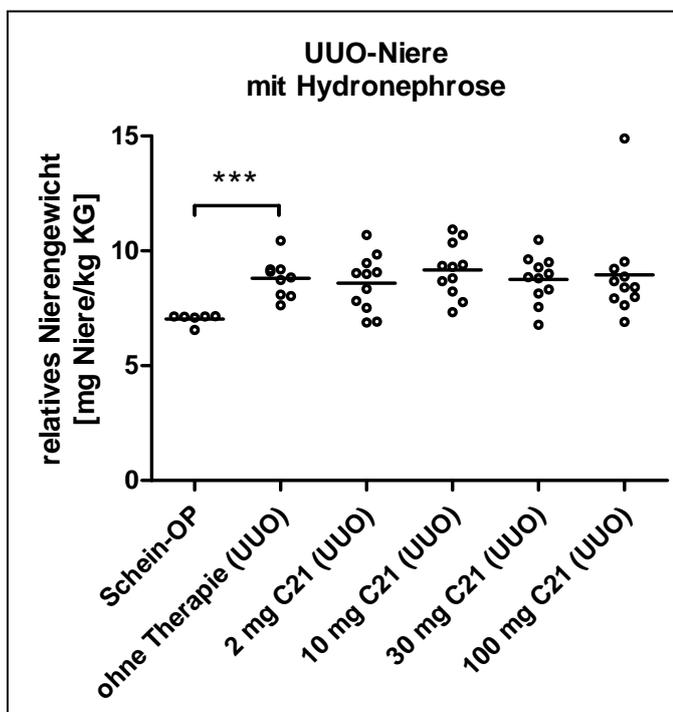


Abb. 18: Gewicht der hydronephrotischen UUO-Niere bezogen auf das Körpergewicht bei Organentnahme in [mg Niere/kg KG], *** $p < 0,001$.

Nach 7-tägiger UUO ist das relative Gewicht der hydronephrotischen UUO-Niere signifikant erhöht. Keine der vier C21-Dosen führt zu einer Gewichtsreduktion.

4.2.5 Verbreiterung des Interstitiums

Die Zunahme des Interstitiums ist ein sehr gut objektivierbarer Parameter einer Nierenschädigung. Da die Grundstruktur des Interstitiums aus Bindegewebe besteht und nicht direkt zur Organfunktion beiträgt, geht eine Zunahme des Interstitiums mit einer Einschränkung der Nierenfunktion einher.

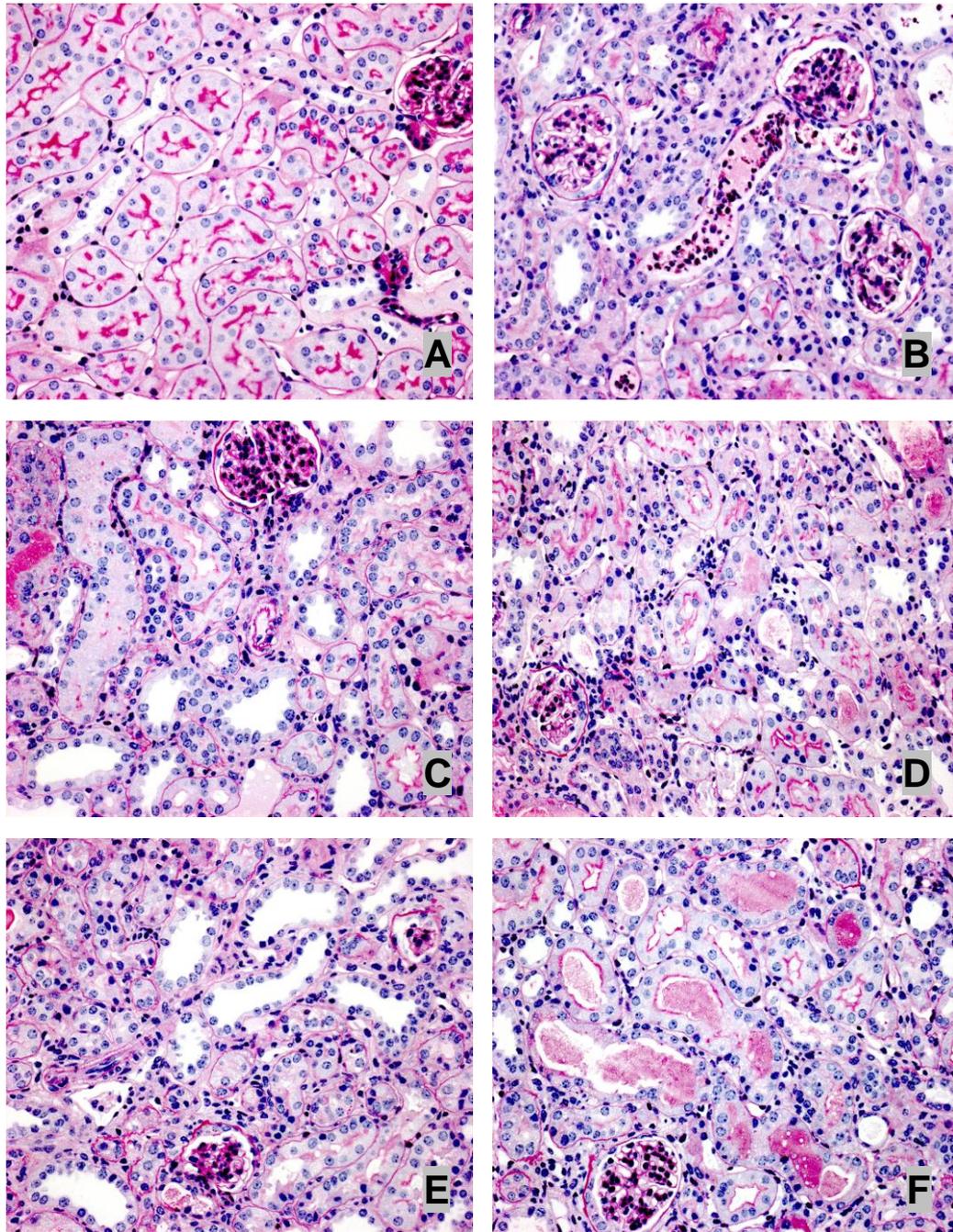


Abb. 19: PAS-Färbung histologischer Schnitte bei 200-facher Vergrößerung.
A: Schein-OP, B: ohne Therapie, C: 2 mg Compound 21 (C 21)/kg Futter,
D: 10 mg C 21, E: 30 mg C 21, F: 100 mg C 21.

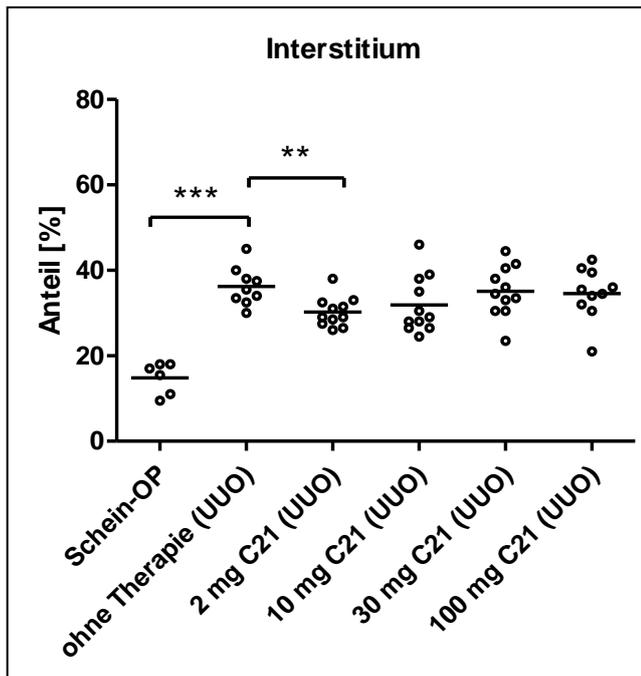


Abb. 20: Interstitiumanteil pro Nierenschnitt in [%],
 $**p < 0,01$, $***p < 0,001$.

Nach 7-tägiger UUO ist der prozentuale Anteil des Interstitiums der UUO-Niere signifikant vergrößert.

Die Therapie mit 2 mg C21/kg Futter senkt die Zunahme mit $p < 0,01$ signifikant. Der Anteil des Interstitiums beträgt 6 % weniger als bei den UUO-Mäusen ohne Therapie.

4.2.6 Fibrose

Das Plasminogen-Aktivator-Inhibitor-1-Protein (PAI-1) gehört zum Typ der Serin-Protease-Inhibitoren. Es reguliert durch die Hemmung des gewebespezifischen Plasminogen-Aktivators (t-PA) und des Urokinase-Plasminogen-Aktivators (u-PA) Fibrinolyse und Proteolyse und dient als Fibrosemarker [36].

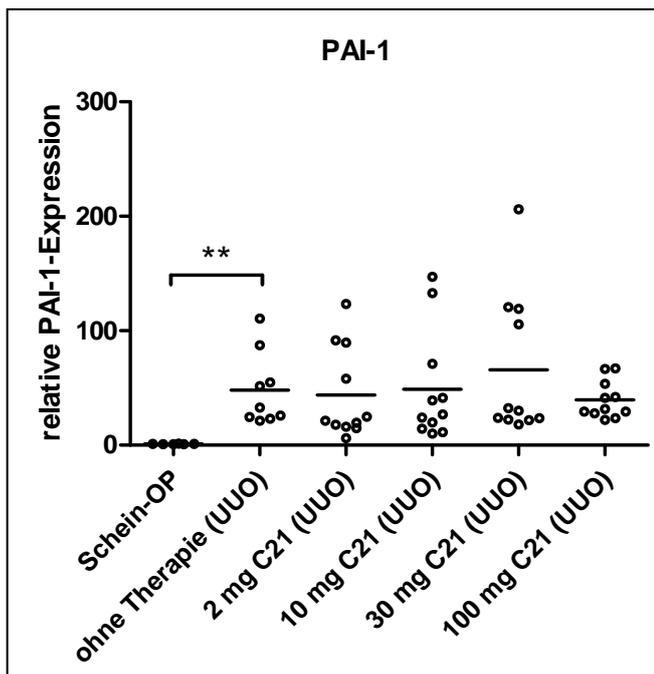


Abb. 21: Relative mRNA-Expression von PAI-1,
 $**p < 0,01$.

Nach 7-tägiger UUO ist die relative Expression von PAI-1 in der UUO-Niere signifikant erhöht. Keine der vier Dosen des selektiven AT_2 -Agonisten Compound 21 reduziert diesen Anstieg.

4.2.7 Monozyten

Durch die histologische Färbung des F4/80-Antigens, einem 160 kD großen Glykoprotein, welches von murinen Makrophagen exprimiert wird, kann man die Anzahl der eingewanderten Makrophagen pro Gesichtsfeld ermitteln.

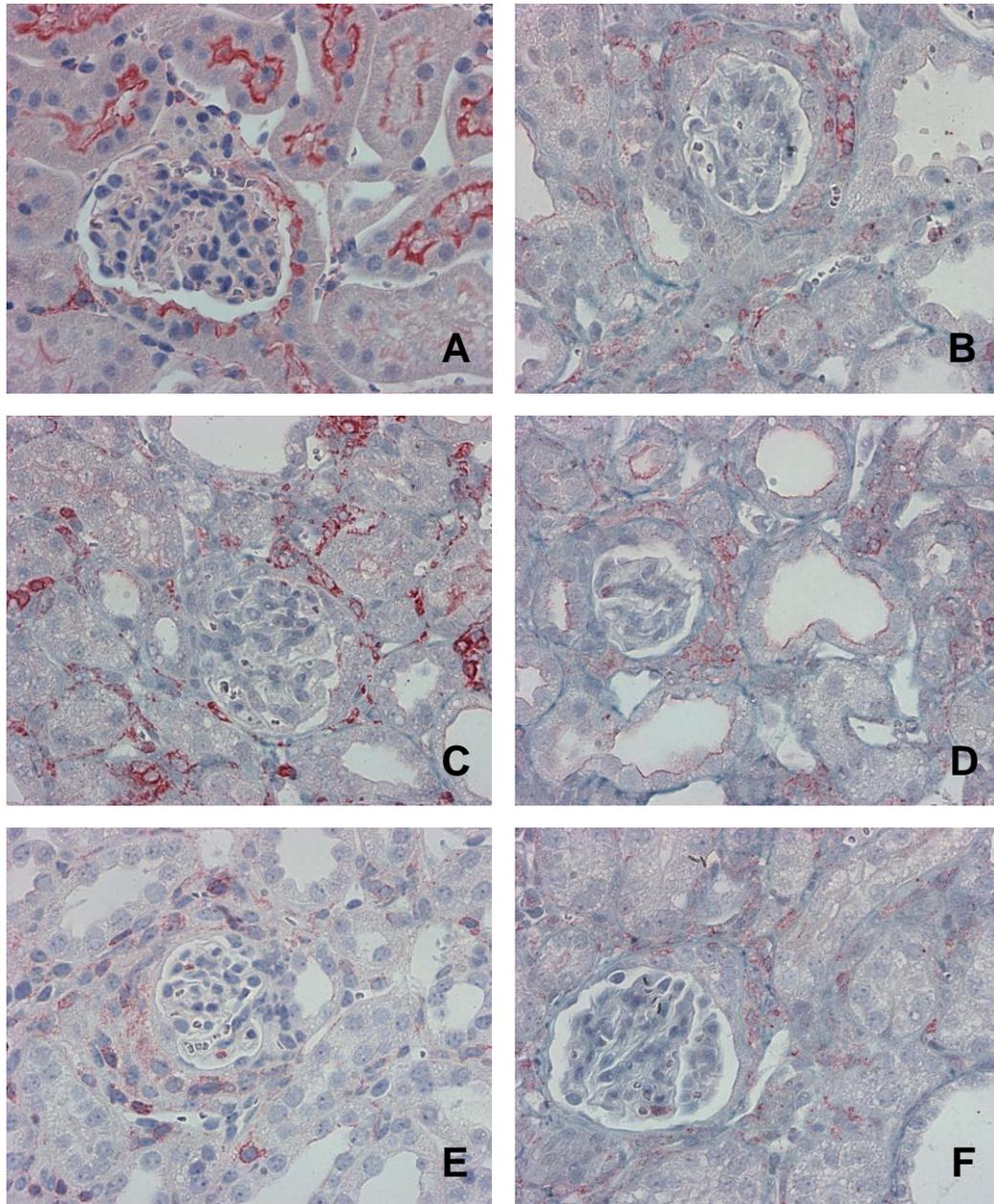


Abb. 22: F4/80-Färbung histologischer Schnitte bei 400-facher Vergrößerung.
A: Schein-OP, B: ohne Therapie, C: 2 mg Compound 21 (C 21)
D: 10 mg C 21, E: 30 mg C 21, F: 100 mg C 21.

Die Auswertung erfolgt bei 400-facher Vergrößerung mithilfe eines Zählrasters. Pro Schnitt wurden 20 Gesichtsfelder mäanderförmig im Bereich des Nierenkortex ausgezählt.

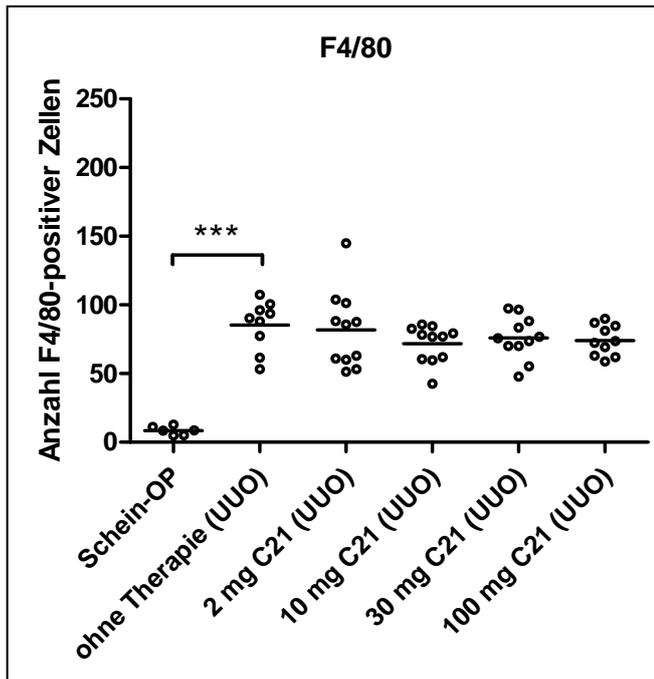


Abb. 23: Durchschnittliche Anzahl F4/80-positiver Zellen pro Raster, *** $p < 0,001$.

Nach 7-tägiger UUO ist die Anzahl eingewanderter F4/80-positiver Zellen in der UUO-Niere signifikant erhöht.

Keine der vier C21-Dosen führt zu einer signifikanten Reduktion.

Die lokale Ausschüttung des proinflammatorischen Chemokins Monocyte chemoattractant Protein-1 (kurz MCP-1 oder auch CCL2 genannt) führt zur Rekrutierung von Monozyten und Makrophagen über deren CCR2-Rezeptor und dient somit als indirekter Monozyten-Marker [37-38].

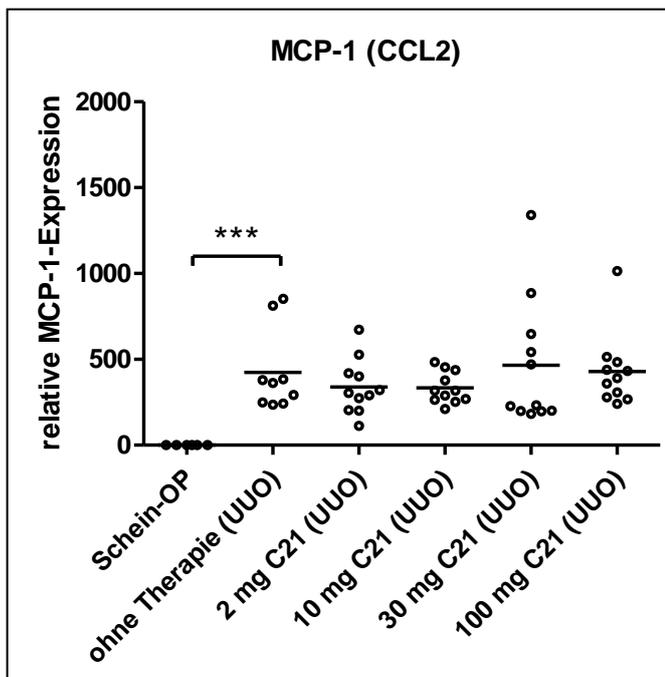


Abb. 24: Relative mRNA-Expression von MCP-1 im Kortex der UUO-Niere, *** $p < 0,001$.

Nach 7-tägiger UUO ist die relative Expression von MCP-1 in der UUO-Niere signifikant erhöht. Die Therapie mit 2 und 10 mg C21/kg Futter führt lediglich zu einer marginalen, aber nicht signifikanten Reduktion.

4.2.8 T-Zellen

Das CD3-Antigen, ein transmembranöser Protein-Komplex, der mit dem T-Zell-Rezeptor (TCR) und der zeta-Kette den so genannten TCR-CD3-Komplex bildet, dient als T-Zell-Parameter.

Histologisch kann das CD3-Antigen durch die CD3-Färbung sichtbar gemacht werden und eine direkte Aussage über die Anzahl der eingewanderten CD3-positiven T-Zellen im Nierenkortex geben. Die Anzahl korreliert mit der Schwere der UUO-bedingten Inflammation.

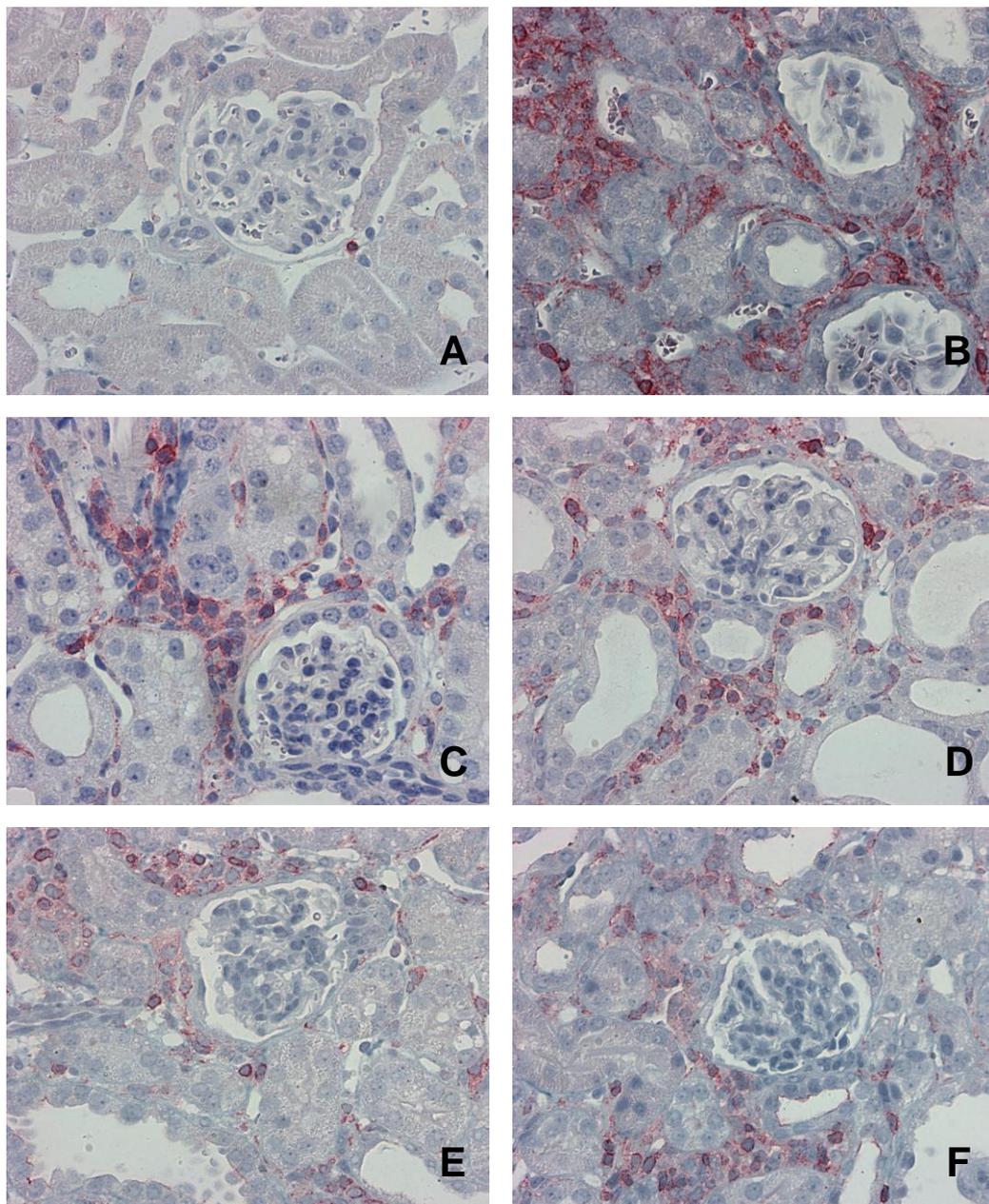


Abb. 25: CD3-Färbung histologischer Schnitte bei 200-facher Vergrößerung.
A: Schein-OP, B: ohne Therapie, C: 2 mg Compound 21 (C 21)
D: 10 mg C 21, E: 30 mg C 21, F: 100 mg C 21.

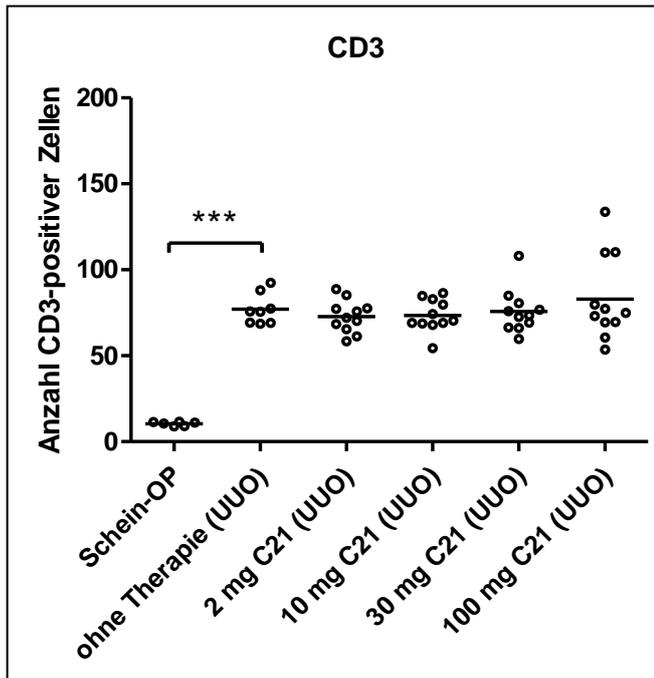


Abb. 26: Durchschnittliche Anzahl CD3-positiver Zellen pro Raster, *** $p < 0,001$.

Nach 7-tägiger UUO ist die Anzahl von eingewanderten CD3-positiven Zellen in der UUO-Niere signifikant erhöht.

Verglichen mit der nicht therapierten Versuchsgruppe senkt keine der vier C21-Dosen den UUO-bedingten Anstieg CD3-positiver Zellen.

Das Interferon induzierbare Protein 10 (IP-10, oder auch CXCL10 genannt) ist ein Chemokin, welches aktivierte T-Zellen über deren hoch exprimierten CXCR3-Rezeptor rekrutiert [39]. Somit handelt es sich um einen indirekten Parameter, der einen Rückschluss auf die Anzahl eingewanderter T-Zellen erlaubt.

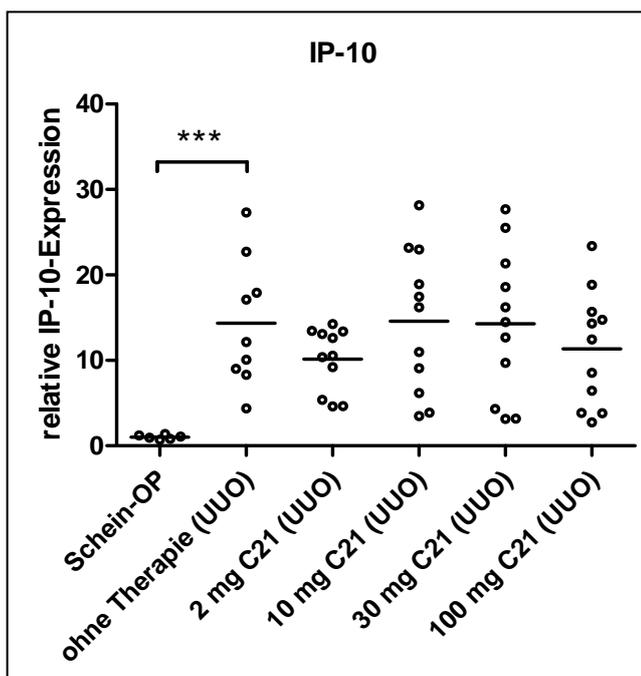


Abb. 27: Relative mRNA-Expression von IP-10 im Kortex der UUO-Niere, *** $p < 0,001$.

Nach 7-tägiger UUO ist die relative Expression von IP-10 in der UUO-Niere signifikant erhöht.

Unter 2 mg C21/kg Futter ist dieser UUO-bedingte Anstieg zwar tendenziell, jedoch nicht signifikant geringer.

4.3 Positivkontrolle

Um einen fehlenden bzw. nur marginalen Benefit des selektiven AT₂-Agonisten Compound 21 abschließend zu belegen, ist eine Positivkontrolle erforderlich. Ein nephroprotektiver Effekt des AT₁-Antagonisten Losartan wurde im Modell der unilateralen Ureterobstruktion bereits in der Ratte nachgewiesen [33]. Sollte dieser Benefit auch in der Maus signifikant sein, so wäre bewiesen, dass AT₁-Antagonismus nephroprotektiver als AT₂-Agonismus ist.

4.3.1 Wahl der Losartan-Dosis

Um eine Unterdosierung von vornherein ausschließen zu können, wurde in unserer Arbeitsgruppe zunächst mithilfe einer Dosis-Wirkungskurve eine suffiziente Dosis ermittelt. Sobald der AT₁-Antagonist Losartan an den AT₁-Rezeptor bindet, fällt der negative Feedback weg, wodurch die relative mRNA-Expression von Renin und somit auch die Renin-Plasmaspiegel ansteigen. Die quantitative Auswertung von Renin-Färbungen mithilfe eines Renin-Scores zeigte, dass der Anstieg der relativen Renin-Expression auf mRNA-Ebene mit der Ausschüttung in den granulierten Epitheloidzellen in der Media des Vas afferens korreliert. Da die Protease Renin Angiotensinogen zu Angiotensin I aufspaltet, lassen Angiotensin I-Plasmaspiegel ebenfalls einen jedoch indirekten Rückschluss auf die Höhe des Renin-Plasmaspiegels zu. Dabei steigen die Angiotensin I-Plasmaspiegel mit steigender Renin-Konzentration an. Bei einer Losartan-Dosis von 500 mg/l Trinkwasser sind relative Renin-Expression, Renin-Score und Angiotensin I-Plasmaspiegel bezogen auf nicht therapierte Kontrollmäuse signifikant erhöht, so dass diese folglich suffiziente Losartan-Dosis für sämtliche Versuche verwendet wird. In der Folge dient die quantitative Bestimmung der relativen mRNA-Expression von Renin als Beweis einer suffizienten Applikation. Zudem wurde der Renin-Inhibitor Aliskiren, dessen nephroprotektive Wirkung in diesem Modell noch nicht bewiesen ist, mit einer Dosis von 50 mg/kg KG als zweite Positivkontrolle verwendet.

4.3.2 Gruppeneinteilung

Die folgenden Daten beruhen auf einem Versuchsdurchgang mit 4 FVB-Mäusen pro Versuchsgruppe. Die Randomisierung in die folgenden Gruppen erfolgte vor Therapiebeginn.

Tabelle 8: Gruppengröße

Versuchsgruppe	Anzahl der Mäuse
Schein-OP	3
UUO ohne Therapie	4
UUO unter 500 mg Losartan/l	4
UUO unter 50 mg Aliskiren/kg KG	4

4.3.3 Körpergewicht

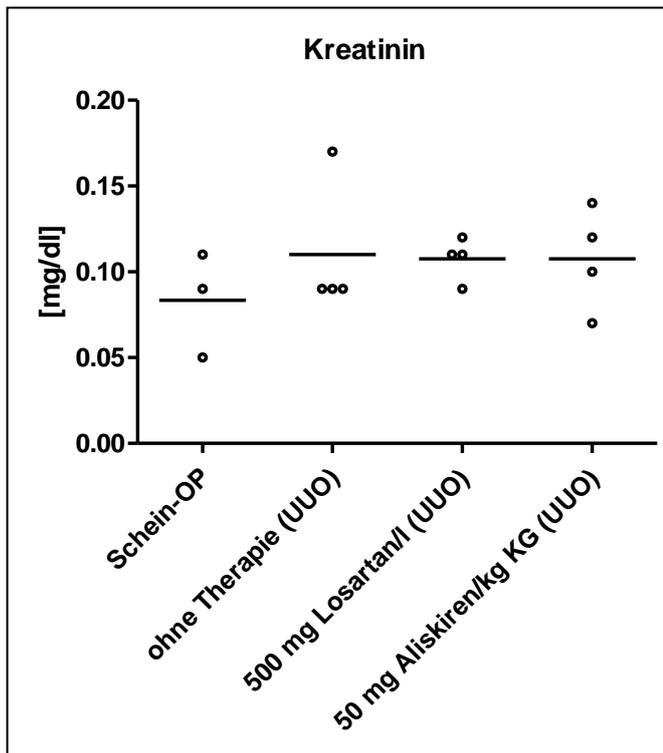
Tabelle 9: Durchschnittliches Körpergewicht (KG) bei Therapiebeginn, bei der unilateralen Ureterobstruktion (UUO) und bei der Organentnahme in [g] ± SEM

	Therapiebeginn	UUO	Organentnahme
Schein-OP	24,7 ± 2,2	25,2 ± 2,2	25,9 ± 2,0
ohne Therapie (UUO)	28,0 ± 0,3	28,3 ± 0,1	27,7 ± 0,5
500 mg Losartan/l (UUO)	27,9 ± 0,5	27,9 ± 0,6	26,9 ± 0,5
50 mg Aliskiren/kg KG (UUO)	27,2 ± 0,3	27,4 ± 0,3	27,3 ± 0,5

Das Gewicht der drei scheinoperierten Kontrollmäuse differiert innerhalb der Gruppe deutlich, da zwei der drei Mäuse erst 8 Wochen alt sind. Es besteht jedoch kein signifikanter Gewichtsunterschied zwischen den 9 Wochen alten FVB-Mäusen der verschiedenen Versuchsgruppen.

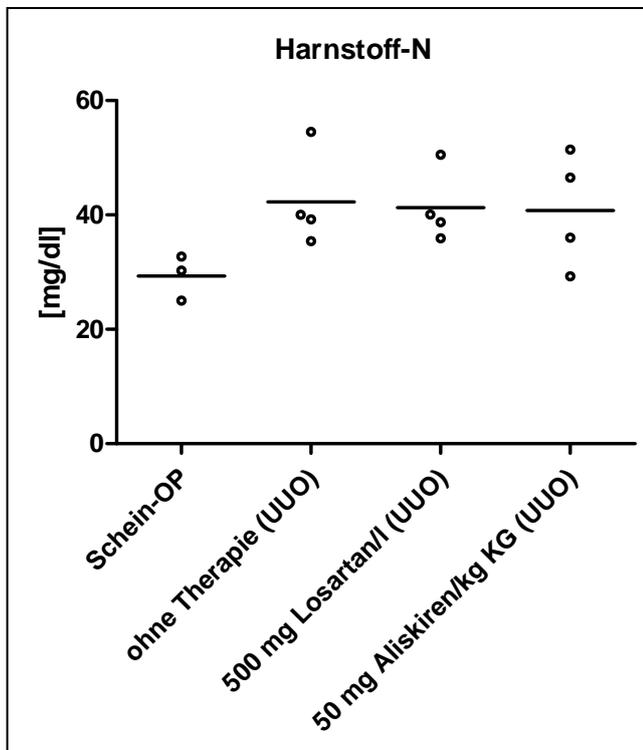
Bei einem Körpergewicht der Aliskiren-Mäuse von durchschnittlich je 27,2 g wird für die vier mikro-osmotischen Pumpen laut *Tabelle 2* unter 3.2.9 bei einer Fördermenge von 0,22 µl/h und einem Füllvolumen von 99 µl folgender Ansatz benötigt: 123,64 mg Aliskiren ad 480 ml H₂O.

4.3.4 Retentionsparameter



Bezogen auf die Gruppe ohne Therapie führt weder Losartan noch Aliskiren zu einer signifikanten Erhöhung oder Reduktion der Kreatininwerte nach UUO.

Abb. 28: Plasmakreatininwerte in [mg/dl].



Bezogen auf die Gruppe ohne Therapie führt weder Losartan noch Aliskiren zu einer signifikanten Erhöhung oder Reduktion der Harnstoffwerte nach UUO.

Abb. 29: Harnstoff-N in [mg/dl].

4.3.5 Relatives Nierengewicht

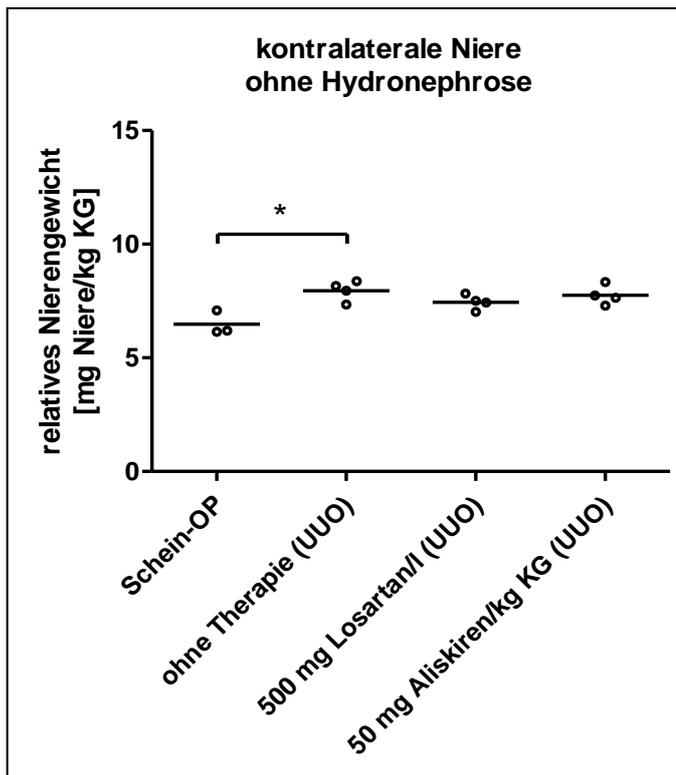


Abb. 30: Gewicht der kontralateralen Niere ohne Hydronephrose bezogen auf das Körpergewicht bei Organentnahme in [mg Niere/kg KG], * $p < 0,05$.

Nach 7-tägiger UUO ist das relative Gewicht der kontralateralen Niere ohne Hydronephrose signifikant erhöht.

Keine der beiden Positivkontrollen führt zu einer signifikanten Gewichtsreduktion.

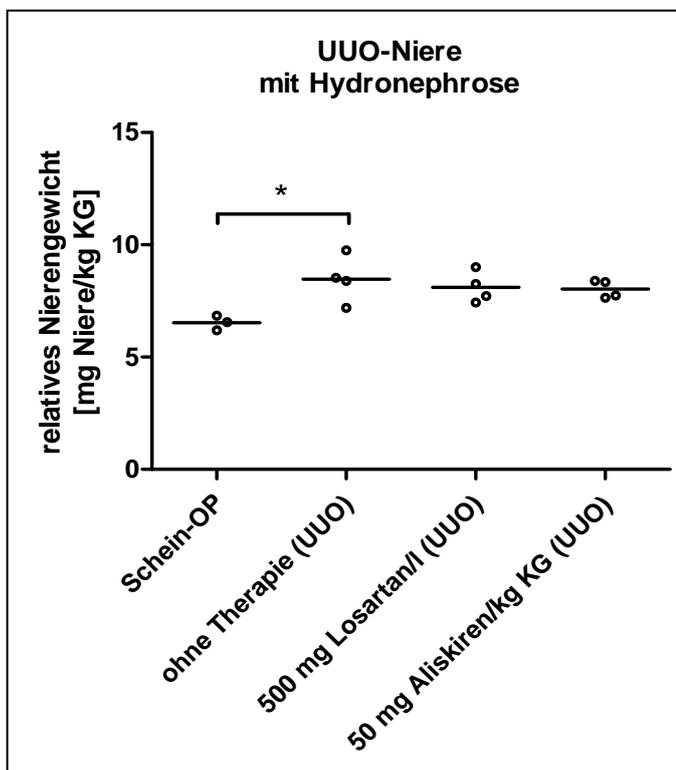


Abb. 31: Gewicht der hydronephrotischen UUO-Niere bezogen auf das Körpergewicht bei Organentnahme in [mg Niere/kg KG], * $p < 0,05$.

Nach 7-tägiger UUO ist das relative Gewicht der hydronephrotischen UUO-Niere signifikant erhöht.

Keine der beiden Positivkontrollen führt zu einer signifikanten Gewichtsreduktion.

4.3.6 Verbreiterung des Interstitiums

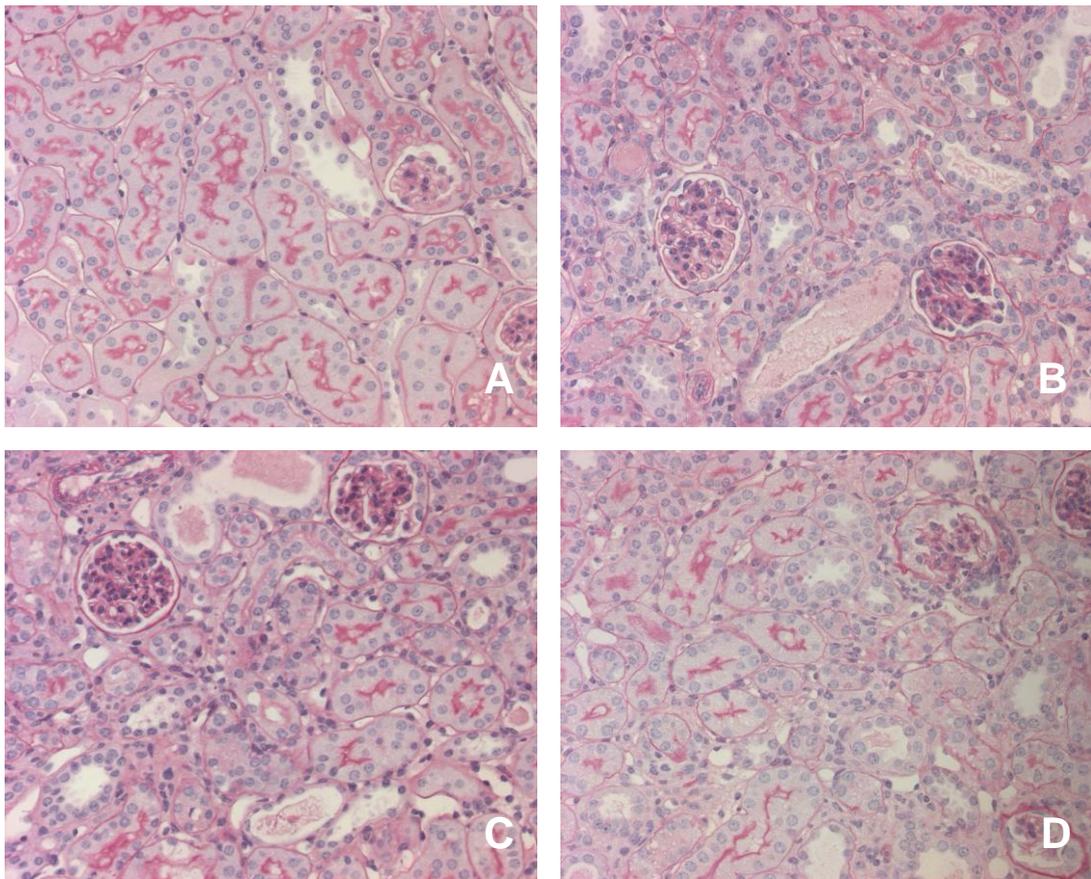


Abb. 32: PAS-Färbung histologischer Schnitte bei 400-facher Vergrößerung. A: Schein-OP, B: UUO ohne Therapie, C: UUO 500 mg Losartan/l, D: UUO 50 mg Aliskiren/kg KG.

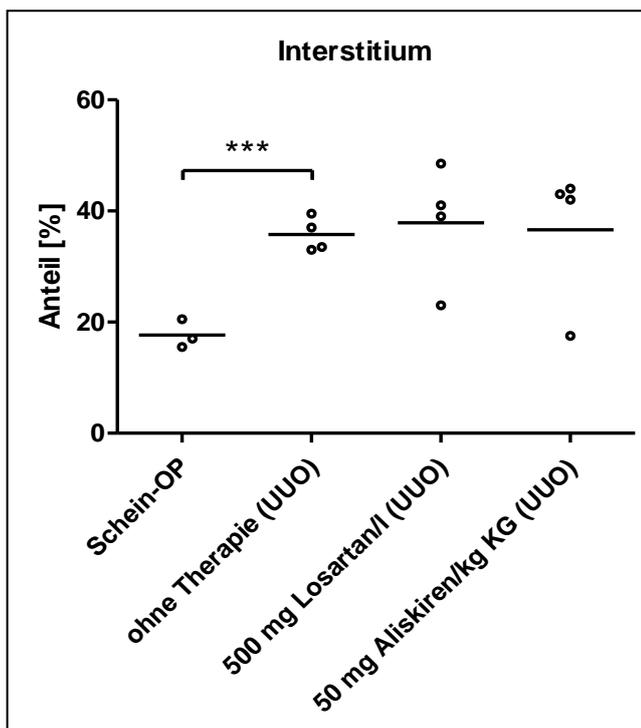


Abb. 33: Interstitiumanteil pro Nierenschnitt in [%], *** $p < 0,001$.

Nach 7-tägiger UUO ist der prozentuale Anteil des Interstitiums der UUO-Niere signifikant vergrößert.

Diese Zunahme ist weder unter der Therapie mit 500 mg Losartan/l noch unter der mit 50 mg Aliskiren/kg KG signifikant reduziert.

4.3.7 Monozyten

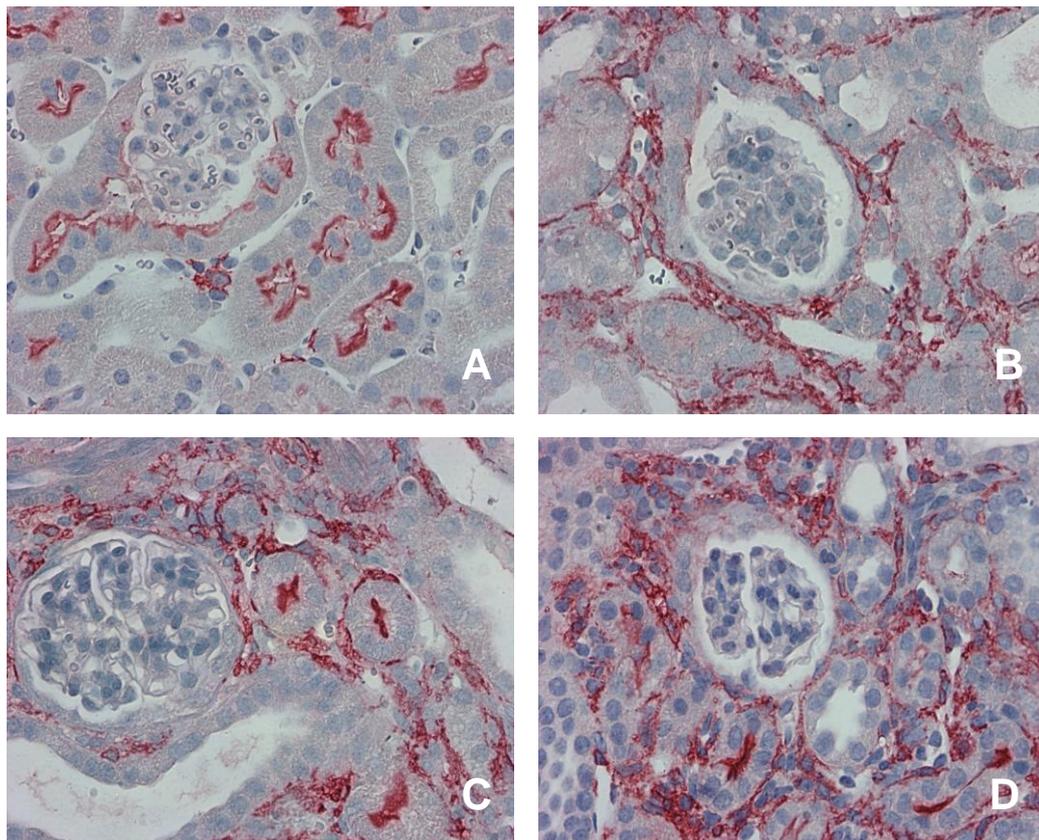


Abb. 34: F4/80-Färbung histologischer Schnitte bei 400-facher Vergrößerung. A: Schein-OP, B: UUO ohne Therapie, C: UUO 500 mg Losartan/l, D: UUO 50 mg Aliskiren/kg KG.

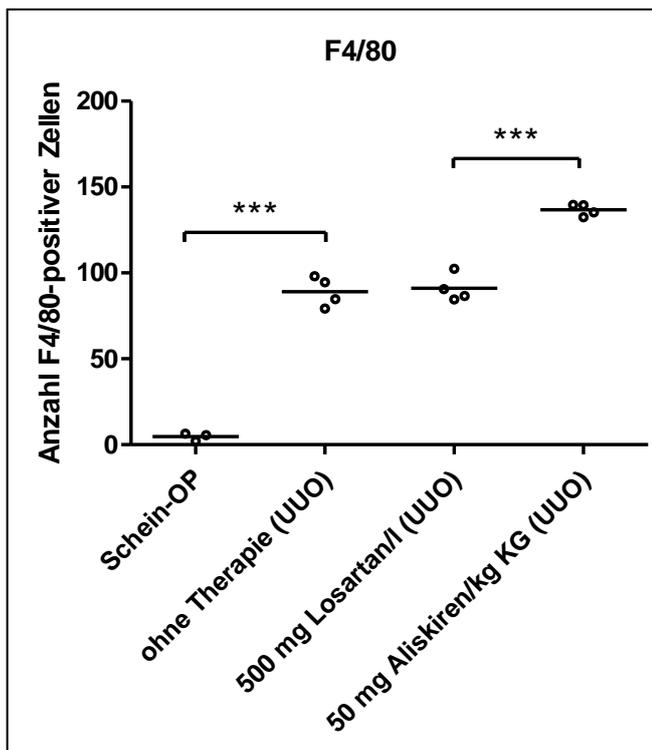
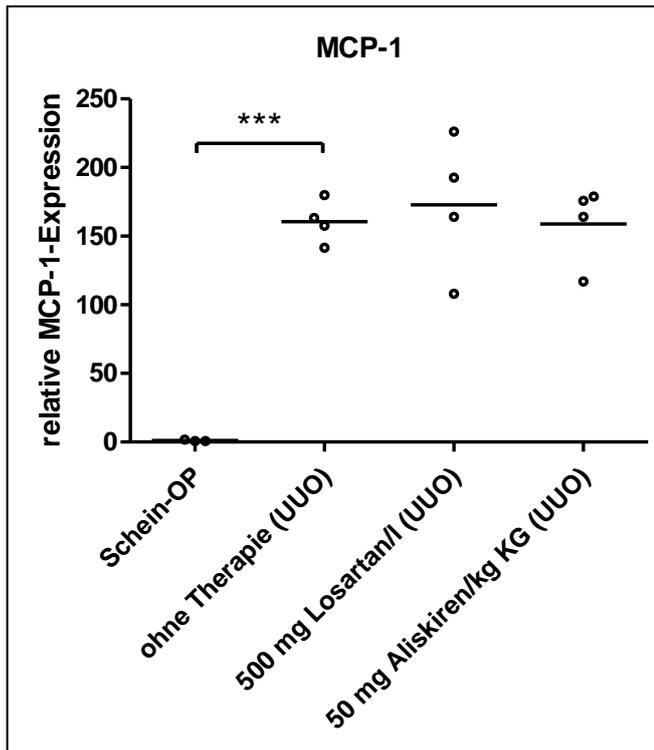


Abb. 35: Durchschnittliche Anzahl F4/80-positiver Zellen, *** $p < 0,001$.

Nach 7-tägiger UUO ist die Anzahl eingewanderter F4/80-positiver Zellen in der UUO-Niere signifikant erhöht.

Unter der Therapie mit 50 mg Aliskiren/kg KG ist die Einwanderung F4/80-positiver Zellen signifikant höher als die in der Gruppe ohne Therapie.



Nach 7-tägiger UUO ist die relative Expression von MCP-1 in der UUO-Niere signifikant erhöht. Dieser Anstieg ist weder unter der Therapie mit 500 mg Losartan/l noch unter der mit 50 mg Aliskiren/kg KG signifikant reduziert.

Abb. 36: Relative mRNA-Expression von MCP-1 im Kortex der UUO-Niere.

4.3.8 T-Zellen

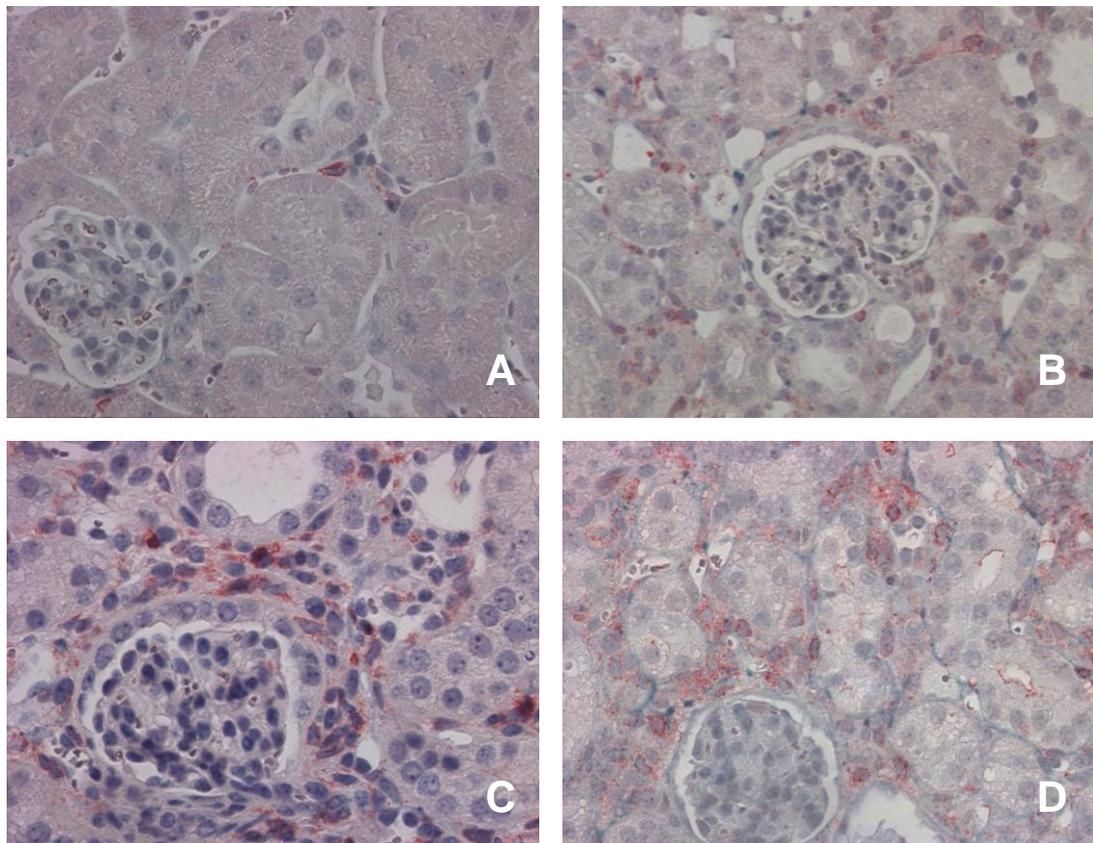


Abb. 37: CD3-Färbung histologischer Schnitte bei 400-facher Vergrößerung
 A: Schein-OP, B: UUO ohne Therapie, C: UUO 500 mg Losartan/l,
 D: UUO 50 mg Aliskiren/kg KG.

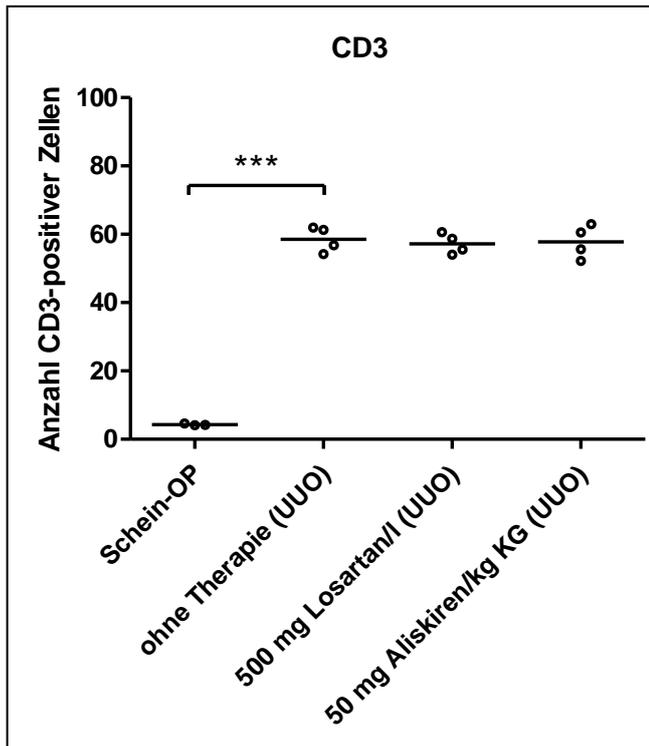


Abb. 38: Durchschnittliche Anzahl CD3-positiver Zellen pro Raster, *** $p < 0,001$.

Nach 7-tägiger UUO ist die Anzahl eingewanderter CD3-positiver Zellen in der UUO-Niere signifikant erhöht.

Verglichen mit der nicht therapierten Versuchsgruppe senkt weder Losartan noch Aliskiren die Einwanderung CD3-positiver Zellen.

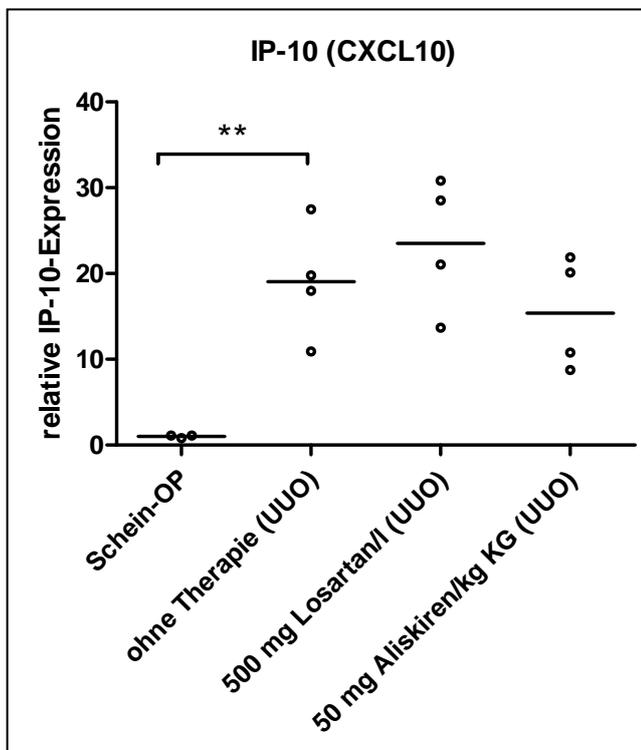


Abb. 39: Relative mRNA-Expression von IP-10 im Kortex der UUO-Niere.

Nach 7-tägiger UUO ist die relative Expression von IP-10 in der UUO-Niere signifikant erhöht.

Dieser Anstieg ist weder unter der Therapie mit 500 mg Losartan/l noch unter der mit 50 mg Aliskiren/kg KG signifikant reduziert.

4.3.9 Fibrose

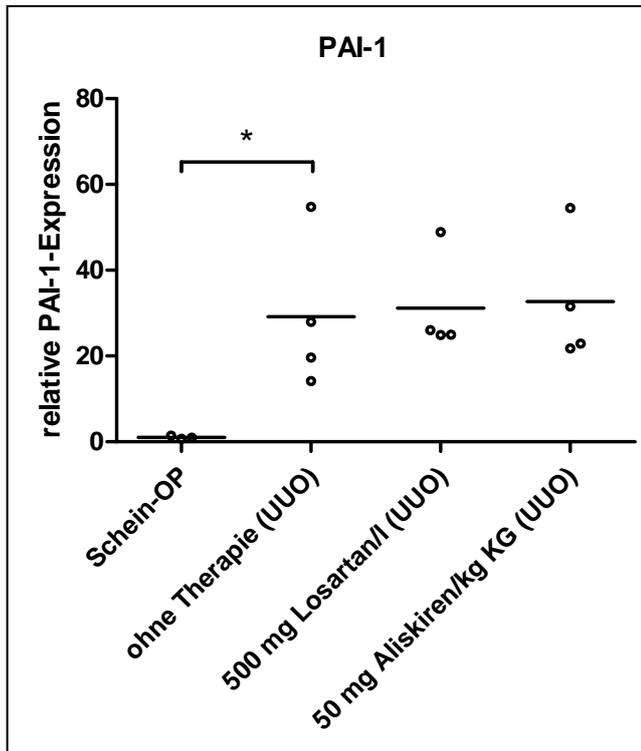


Abb. 40: Relative mRNA-Expression von PAI-1 im Kortex der UUO-Niere, * $p < 0,05$.

Nach 7-tägiger UUO ist die relative Expression von PAI-1 in der UUO-Niere signifikant erhöht. Verglichen mit der nicht therapierten Gruppe wird dieser Anstieg weder unter der Therapie mit 500 mg Losartan/l noch unter der mit 50 mg Aliskiren/kg KG reduziert.

4.3.10 Nachweis klinisch relevanter Plasmaspiegel

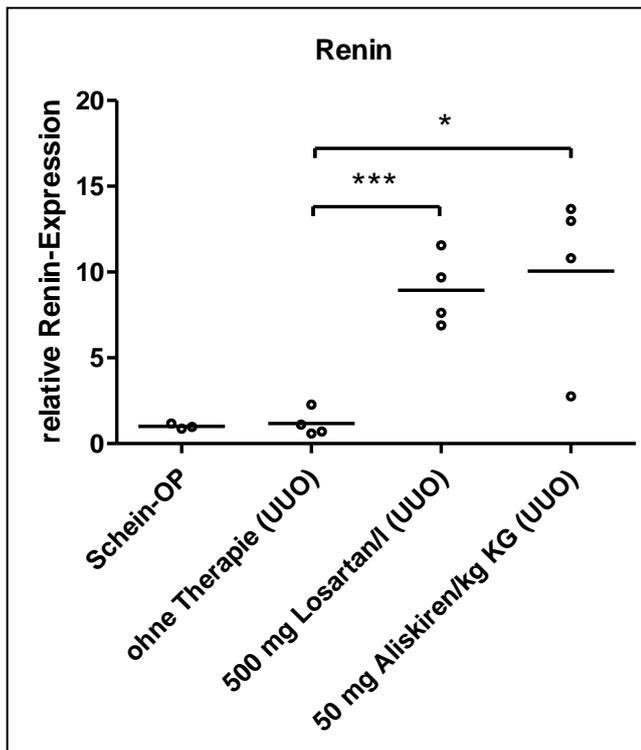


Abb. 41: Relative mRNA-Expression von Renin im Kortex der kontralateralen Niere, * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$.

Sowohl die Losartan- als auch die Aliskiren-Gruppe weisen eine signifikant erhöhte Renin-Expression auf. Folglich wurden beide Medikamente in wirksamer Konzentration aufgenommen.

4.4 Vorzeitige Organentnahme an Tag 3 nach UUO

In C57BL/6-Mäusen ist an Tag 3, jedoch nicht an Tag 7 nach UUO ein tendenziell antiinflammatorischer Effekt nachweisbar (Daten nicht gezeigt). Dieser abschließende Versuch soll zeigen, ob UUO-bedingte Nierenschädigungen in der frühen Phase, also bereits an Tag 3 nach UUO, unter der Therapie mit 500 mg Losartan/l, 50 mg Aliskiren/kg KG oder 2 mg Compound 21 (gemäß pharmakologischen Überlegungen die ideale Dosis des selektiven AT₂-Agonisten) in FVB-Mäusen reduziert sind.

Tabelle 10: Gruppengröße

Versuchsgruppe	Anzahl der Mäuse
Schein-OP	2
ohne Therapie	4
500 mg Losartan/l (UUO)	4
50 mg Aliskiren/kg KG (UUO)	4
2 mg Compound 21 (UUO)	3

4.4.1 Körpergewicht

Tabelle 11: Durchschnittliches Körpergewicht (KG) bei Therapiebeginn, bei der unilateralen Ureterobstruktion und bei der Organentnahme in [g] ± SEM

	Therapie- beginn	UUO	Organ- entnahme
Schein-OP	27,7 ± 0,6	28,5 ± 1,0	28,3 ± 1,0
ohne Therapie	28,0 ± 0,6	28,9 ± 0,8	28,4 ± 0,8
500 mg Losartan/l (UUO)	29,4 ± 0,7	29,5 ± 0,5	28,2 ± 0,3
50 mg Aliskiren/kg KG (UUO)	27,0 ± 0,8	30,2 ± 0,8	28,5 ± 0,9
2 mg Compound 21 (UUO)	28,6 ± 0,9	29,7 ± 0,7	27,1 ± 0,8

Bei einem Körpergewicht der Aliskiren-Mäuse von durchschnittlich je 27,2 g wird für die vier mikro-osmotischen Pumpen laut *Tabelle 2* unter 3.2.9 bei einer Fördermenge von 0,22 µl/h und einem Füllvolumen von 99 µl folgender Ansatz benötigt: 122,73 mg Aliskiren ad 480 ml H₂O.

4.4.2 Relatives Nierengewicht

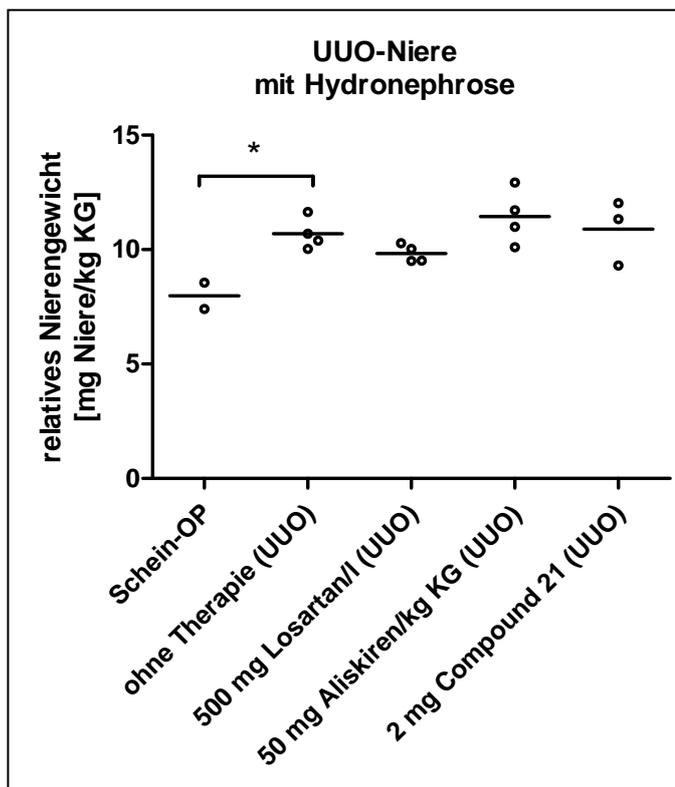


Abb. 42: Gewicht der hydronephrotischen UOO-Niere bezogen auf das Körpergewicht bei Organentnahme in [mg Niere/kg KG], * $p < 0,05$.

Nach 3-tägiger UOO ist das relative Gewicht der hydronephrotischen UOO-Niere signifikant erhöht.

Dieser Anstieg ist unter Therapie mit 500 mg Losartan/l tendenziell, jedoch nicht signifikant geringer.

4.4.3 Verbreiterung des Interstitiums

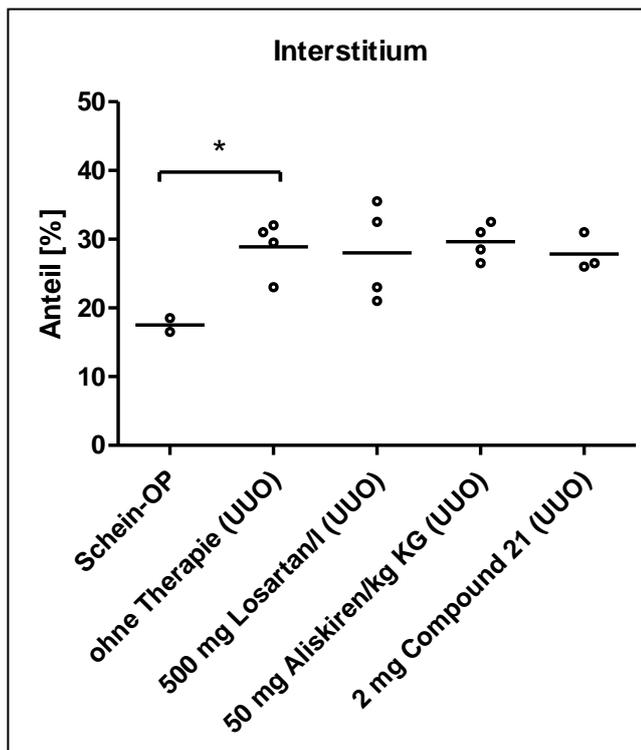


Abb. 43: Interstitiumanteil pro Nierenschnitt in [%], * $p < 0,05$.

Nach 3-tägiger UOO ist der prozentuale Anteil des Interstitiums der UOO-Niere signifikant vergrößert.

Keine der drei Therapievarianten bewirkt eine signifikante Reduktion.

4.4.4 Fibrose

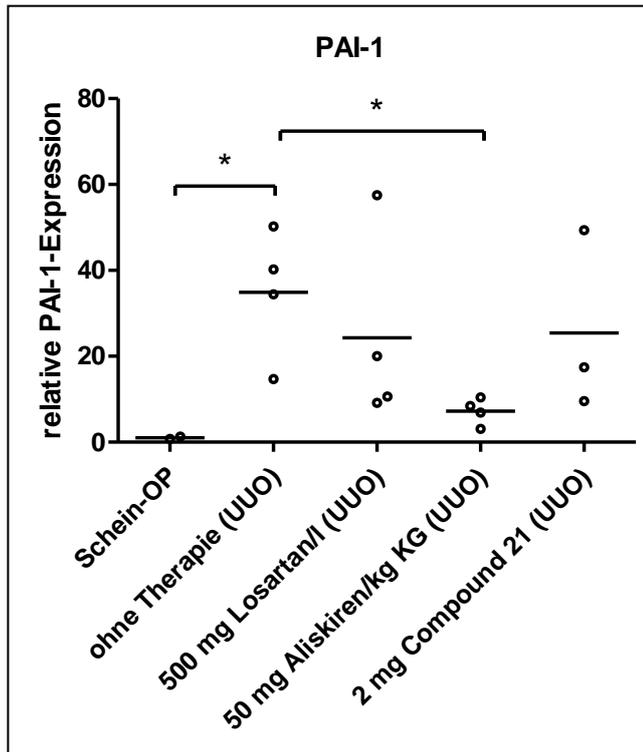


Abb. 44: Relative mRNA-Expression von PAI-1 im Kortex der UUO-Niere, * $p < 0,05$.

Nach 3-tägiger UUO ist die relative Expression von PAI-1 in der UUO-Niere signifikant erhöht. Aliskiren reduziert diesen Anstieg mit $p < 0,05$ signifikant.

Fibronectin ist ein extrazelluläres Matrixprotein und dient neben PAI-1 als weiterer Fibrose-Marker.

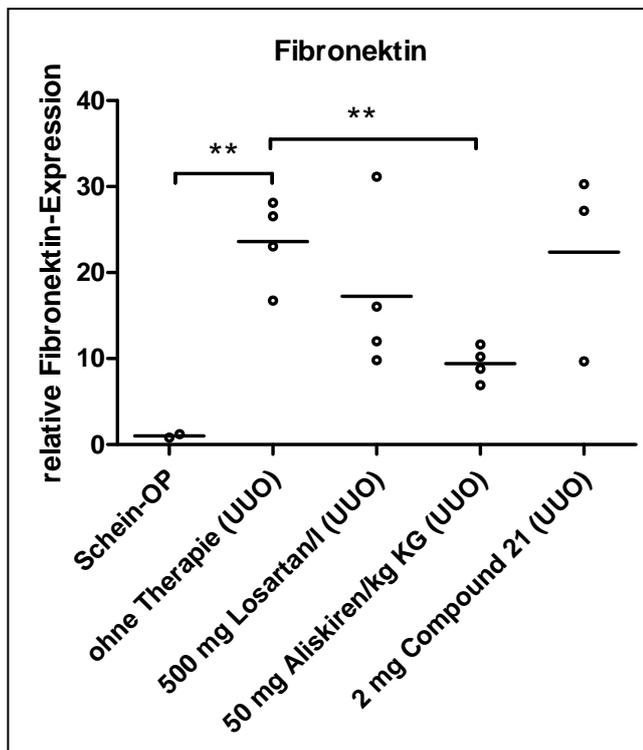


Abb. 45: Relative mRNA-Expression von Fibronectin, ** $p < 0,01$.

Nach 3-tägiger UUO ist die relative Expression von Fibronectin in der UUO-Niere signifikant erhöht.

Unter der Therapie mit Aliskiren ist auch dieser Anstieg mit $p < 0,01$ signifikant geringer.

4.4.5 Monozyten

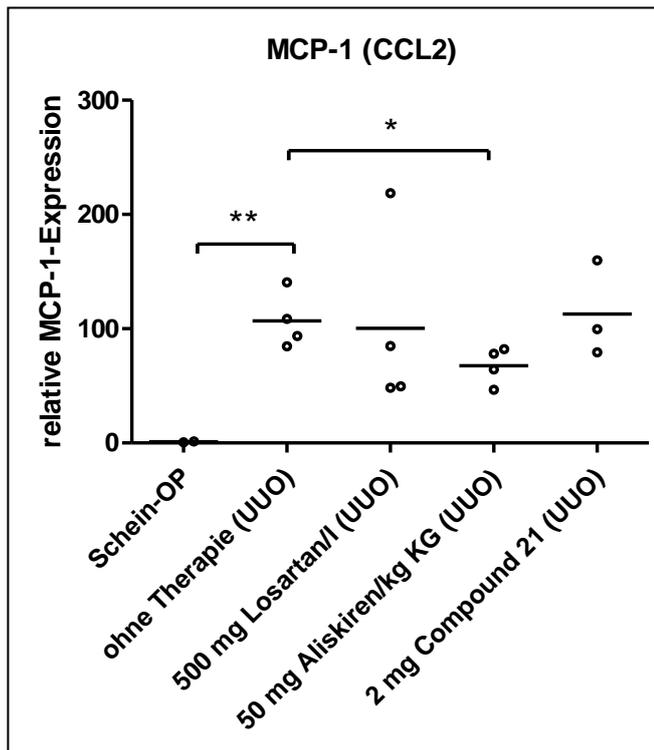


Abb. 46: Relative mRNA-Expression von MCP-1 im Kortex der UUO-Niere, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

Nach 3-tägiger UUO ist die relative Expression von MCP-1 in der UUO-Niere signifikant erhöht. Unter der Therapie mit 50 mg Aliskiren/kg KG ist der Anstieg mit $p < 0,05$ signifikant geringer.

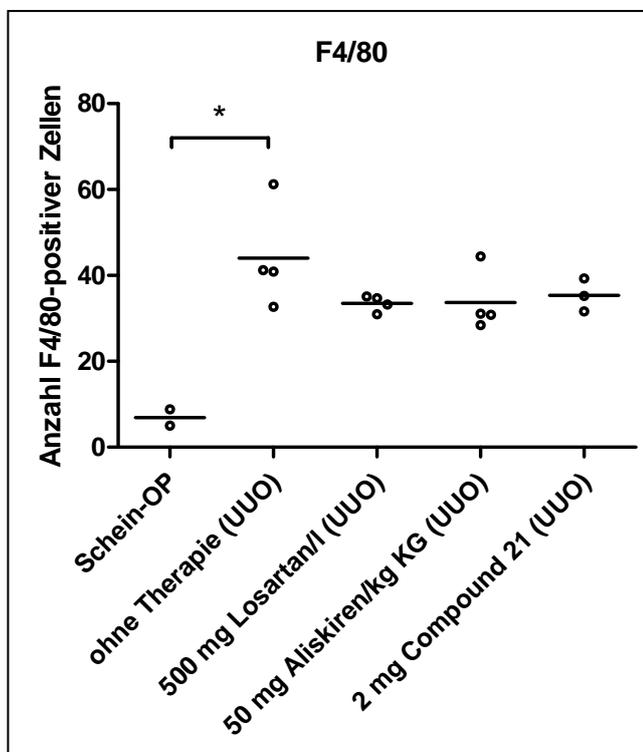


Abb. 47: Durchschnittliche Anzahl F4/80-positiver Zellen pro Raster, * $p < 0,05$.

Nach 3-tägiger UUO ist die Anzahl F4/80-positiver Zellen in der UUO-Niere signifikant erhöht. Die Therapie mit allen drei Medikamenten führt zu einer tendenziellen, jedoch nicht signifikanten Reduktion F4/80-positiver Zellen.

4.4.6 T-Zellen

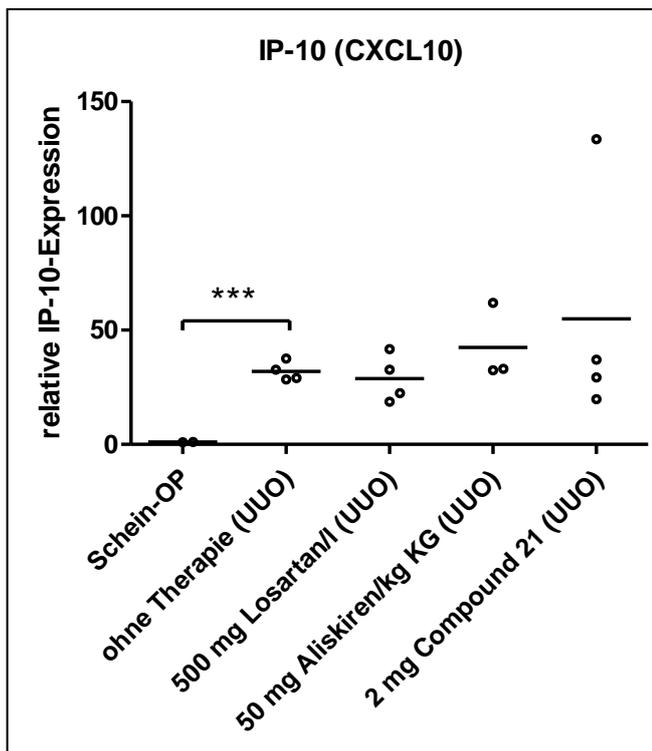


Abb. 48: Relative mRNA-Expression von IP-10 im Kortex der UUO-Niere, *** $p < 0,001$.

Nach 3-tägiger UUO ist die relative Expression von IP-10 in der UUO-Niere signifikant erhöht. Dieser Anstieg wurde durch keine der drei verwendeten Therapievarianten reduziert.

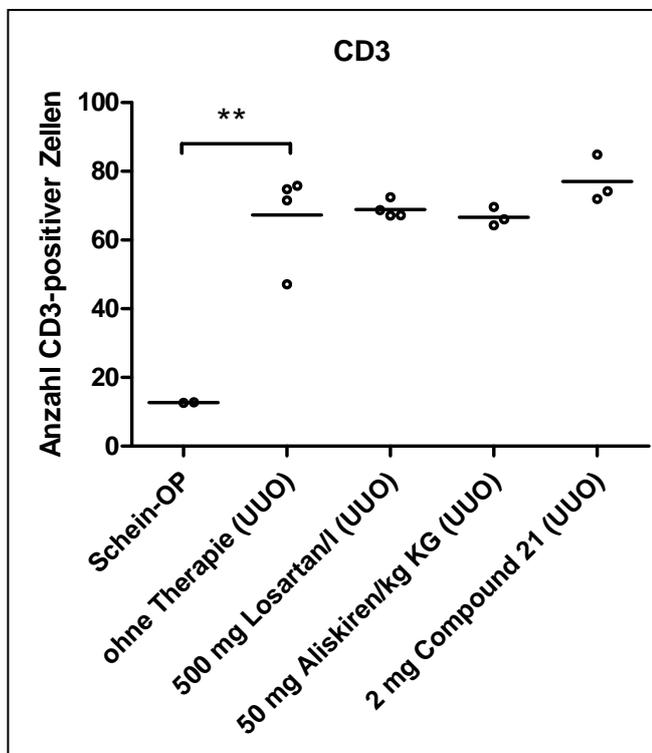


Abb. 49: Durchschnittliche Anzahl CD3-positiver Zellen pro Raster, ** $p < 0,01$.

Nach 3-tägiger UUO ist die Anzahl CD3-positiver Zellen in der UUO-Niere signifikant erhöht. Dieser Anstieg wurde durch keine der drei verwendeten Therapievarianten reduziert.

4.4.7 Nachweis klinisch relevanter Plasmaspiegel

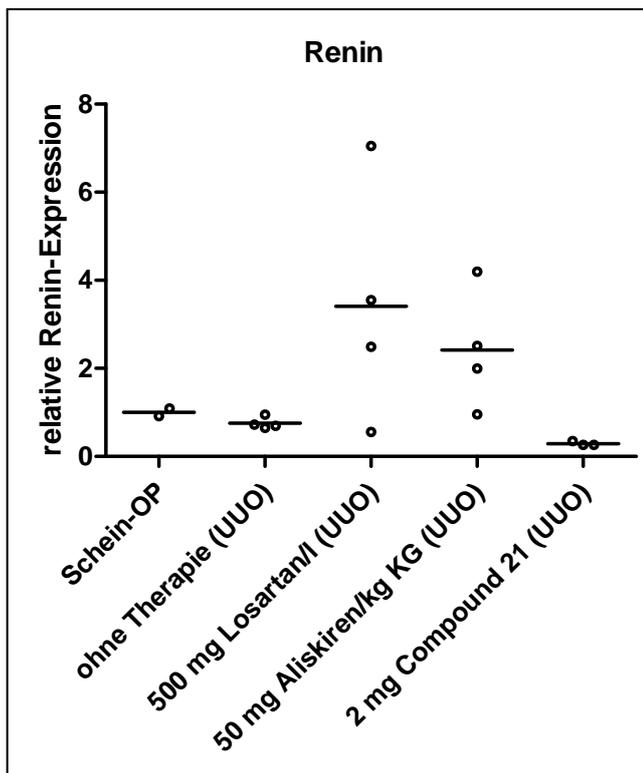


Abb. 50: Relative mRNA-Expression von Renin im Kortex der kontralateralen Niere.

Unter Blockade des RAAS kommt es sowohl in der Aliskiren- als auch in der Losartan-Gruppe zum Anstieg der relativen Renin-Expression.

C21 hat keinen Effekt.

Aufgrund der unterschiedlich stark angestiegenen relativen Renin-Expression sind zusätzlich die bestimmten Plasmaspiegel dargestellt.

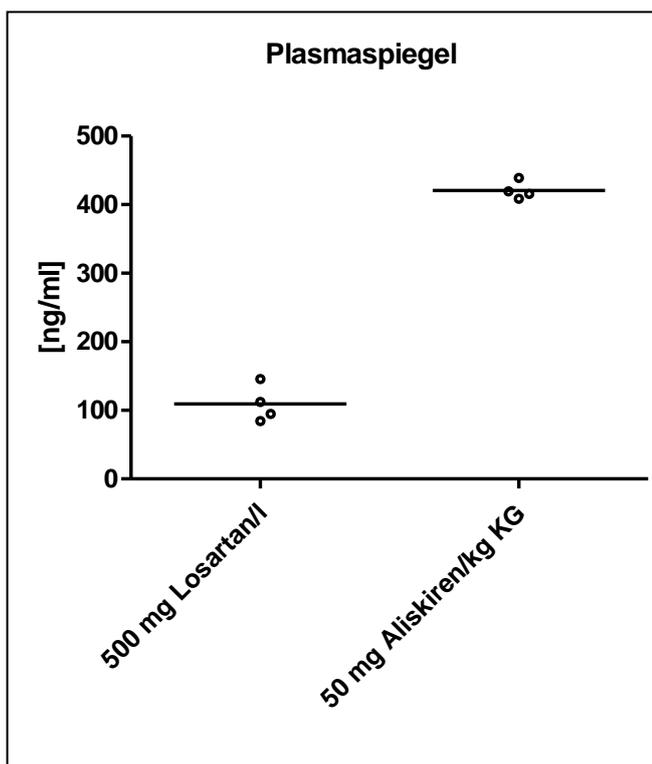


Abb. 51: Losartan- und Aliskiren-Plasmaspiegel in [ng/ml].

In beiden therapierten Versuchsgruppen sind die Plasmaspiegel des jeweiligen applizierten Medikamentes deutlich nachweisbar. Somit ist bewiesen, dass sowohl der AT₁-Antagonist Losartan als auch der Renin-Inhibitor Aliskiren von allen Mäusen in ausreichender Menge aufgenommen wurden.

5. Diskussion

5.1 Wahl des Mausstammes

Der C57BL/6-Mausstamm ist der etablierteste Mausstamm, in dem die meisten Versuche durchgeführt werden und der häufig als Hintergrund für transgene und Knockout-Mäuse verwendet wird [40]. C57BL/6-Mäuse weisen jedoch oft eine Resistenz gegenüber renalen Endorganschäden auf. Somit ist die Übertragung von etablierten in vivo Krankheitsmodellen der Ratte bezüglich chronischer Nierenerkrankungen nicht auf diesen Mausstamm möglich. Die großen mausstammspezifischen Unterschiede bezüglich Endorganschäden, Proteinurie und Inflammation der Niere beruhen nicht auf strukturellen Unterschieden der glomerulären Ultrastruktur, sondern möglicherweise auf funktionellen Unterschieden der glomerulären Permeabilität [40]. Anders als Mäuse mit C57BL/6-Hintergrund [41-42] weisen Mäuse mit FVB-Hintergrund keine Resistenz gegenüber einer Proteinurie auf. Sie entwickeln nach renaler Ablation, welche auch als 5/6-Nephrektomie bezeichnet wird, eine chronische Niereninsuffizienz mit progredienter Albuminurie, Inflammation und Fibrose. Im renalen Ablationsmodell wurde bereits gezeigt, dass die renale Ablation bei AT₂-Knockout-Mäusen mit FVB-Hintergrund zu einer Aggravation der Nierenschäden und einer Erhöhung der Mortalität führt [11]. Das Modell der renalen Ablation ist jedoch ein sehr anspruchsvolles und zeitaufwändiges Modell einer chronischen Niereninsuffizienz und eignet sich aufgrund der hohen Variabilität nicht für Dosisfindungs-Experimente. Stattdessen wurde das etablierte und gut reproduzierbare Modell der unilateralen Ureterobstruktion (UUO) für die Dosisfindung gewählt. Von den zahlreichen publizierten UUO-Versuchen wurden nur drei in Mäusen mit FVB-Hintergrund durchgeführt [43-45] – keiner davon beinhaltet die pharmakologische Modulation des Renin-Angiotensin-Systems. Es ist das langfristige Ziel die ideale Dosis des neuen selektiven AT₂-Agonisten Compound 21 im Modell der renalen Ablation allein und in Kombination mit dem AT₁-Antagonisten Losartan zu testen. Da dies nur in Mäusen mit FVB-Hintergrund möglich ist, erfolgte bereits die Dosisfindung im Modell der unilateralen Ureterobstruktion in FVB-Mäusen.

5.2 Wahl der Versuchsdauer

Im Jahr 2008 hat cand. med. Schmidt-Haupt in unserer Arbeitsgruppe UUO-bedingte Nierenschäden von Wildtyp-Mäusen mit denen von MPO-Knockout-Mäusen verglichen. Bei zweizeitiger Organentnahme an Tag 3 und 7 nach UUO waren die Unterschiede von Inflammation und Fibrose an Tag 7 deutlich ausgeprägter. Deshalb wurde dieser Zeitpunkt auch für die Experimente mit dem selektiven AT₂-Agonisten Compound 21 gewählt.

5.3 Ergebnisse

5.3.1 Applikation von Compound 21

Bei der Entwicklung des AT₂-Agonisten Compound 21 wurde eine Halbwertszeit von etwa 4 Stunden in der Ratte ermittelt [12]. Da Mäuse dämmerungs- und nachtaktiv sind und vor allem nachts fressen, ist es von klinischem Interesse wie lange Compound 21 nach morgendlichem Absetzen des Spezialfutters im Blut nachweisbar ist. Bei dieser Simulation einer tagsüber bestehenden Futterkarenz wurde gezeigt, dass die Plasmaspiegel nach etwa 5 Stunden halbiert sind. Sollten die Mäuse tatsächlich nur nachts Futter zu sich nehmen, bestünde folglich die Gefahr, dass sie tagsüber keine wirksamen Plasmaspiegel haben. Somit wäre die notwendige 24-Stunden-Wirksamkeit nicht gewährleistet. Unsere Daten zeigen jedoch, dass die Plasmaspiegel bei dauerhaftem Zugang zum Futter morgens und abends vergleichbar sind. Daraus folgt, dass die Mäuse offenbar auch tagsüber fressen. Dies stimmt mit unseren Beobachtungen überein. Damit wurde erstmals und eindeutig gezeigt, dass der AT₂-Agonist Compound 21 den Mäusen in Form von Spezialfutter mit einer 24-Stunden-Wirksamkeit oral appliziert werden kann.

Die gewählten Dosen 2, 10, 30 und 100 mg Compound 21/kg Futter entsprechen bei einer durchschnittlichen Fressmenge von 3 g pro Tag in etwa 0.006, 0.03, 0.09 und 0.3 mg/kg KG. Bei dem Nachweis einer kardioprotektiven Wirkung nach induziertem Myocardinfarkt in Wistar Ratten wurden täglich 0.01, 0.03 und 0.3 mg Compound 21/kg KG intraperitoneal appliziert [14]. Nach oraler Compound 21-Gabe wurde in der Ratte eine Bioverfügbarkeit von 20-30 % nachgewiesen [12], welche nach intraperitonealer Applikation jedoch deutlich höher sein müsste.

Da bei der erwähnten Studie jedoch weder die Bioverfügbarkeit nach intraperitonealer Applikation noch die Plasmaspiegel bestimmt wurden, ist ein Vergleich bezüglich einer Unter- oder Überdosierung schwierig. Unsere Plasmaspiegel wurden nach demselben Protokoll bestimmt, welches bereits beim Design des AT₂-Agonisten verwendet wurde. Gemäß pharmakologischen Überlegungen liegt die ideale Dosis eines Medikaments vor, wenn im Serum der 10-fache Wert der Bindungskonstanten K_i erreicht wird. Der AT₂-Agonist Compound 21 hat eine K_i von 0,4 nM [12], so dass die Compound 21-Plasmaspiegel idealerweise 5 mM betragen sollten. Es zeigte sich, dass die niedrigste Dosis in Höhe von 2 mg Compound 21/kg Futter der idealen Dosis entsprechen müsste, bei der am ehesten ein Effekt zu erwarten ist. Die Bestimmung der Plasmaspiegel ergab zudem, dass diese der verabreichten Dosis entsprechend ansteigen. Die Plasmaspiegel unterliegen aufgrund des individuellen Fressverhaltens gewissen Schwankungen. Je höher die mit dem Futter applizierte Compound 21-Dosis war, desto höher war folglich auch die Standardabweichung der Plasmaspiegel. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass eine höhere Konzentration des selektiven AT₂-Agonisten Compound 21 im Futter nicht dazu führt, dass die Tiere weniger fressen. Da die Selektivität des AT₂-Agonisten Compound 21 belegt ist [12] und bei allen therapierten Mäusen Plasmaspiegel nachweisbar waren, beruhen die folgenden Ergebnisse nachweislich auf einer selektiven Stimulation des AT₂-Rezeptors.

5.3.2 Hauptversuch – 7 Tage UUO

Im renalen Ablationsmodell wurde gezeigt, dass AT₂-Rezeptor-Defizienz Nierenschäden nach renaler Ablation aggraviert und zu erhöhter Mortalität führt [11]. Im Umkehrschluss wurde vermutet, dass selektive AT₂-Rezeptor-Stimulation mit Compound 21 antiinflammatorisch, antifibrotisch und somit nephroprotektiv wirkt. Diese Hypothese sollte im Modell der unilateralen Ureterobstruktion überprüft und verifiziert werden. Die folgenden Ergebnisse beruhen auf vier voneinander unabhängigen Versuchsdurchgängen mit jeweils 2-3 FVB-Mäusen pro Versuchsgruppe und beziehen sich auf die hydronephrotische UUO-Niere.

Die unilaterale Ureterobstruktion führte zu einer signifikanten Zunahme des prozentualen Interstitiumanteils, der relativen mRNA-Expression von PAI-1, MCP-1 und IP-10 sowie der Anzahl CD3- und F4/80-positiver Entzündungszellen. Unter 2 mg Compound 21/kg Futter, der theoretisch idealen Dosis des AT₂-Agonisten, war die Vergrößerung des Interstitiums ohne organspezifische Zellen mit $p < 0,01$ signifikant geringer. Der Anstieg der relativen PAI-1-Expression, die als Fibrose-Marker dient, wurde durch keine der vier verwendeten Compound 21-Dosen reduziert. Auf mRNA-Ebene dient das Chemokin MCP-1 (CCL2) und histologisch das F4/80-Molekül als Monozyten-Marker. Unter der Therapie mit 2 und 10 mg Compound 21/kg Futter war der Anstieg der relativen MCP-1-Expression numerisch, jedoch nicht signifikant geringer als die der untherapierten Mäuse. Auch histologisch führte die Therapie mit 10 mg Compound 21/kg Futter lediglich zu einer tendenziellen, jedoch nicht signifikanten Reduktion eingewanderter Monozyten. Als T-Zell-Marker dient auf mRNA-Ebene die relative mRNA-Expression des Chemokins IP-10 (CXCL10) und histologisch das CD3-Antigen. Unter der Therapie mit 2 mg Compound 21/kg Futter war die relative mRNA-Expression von IP-10 tendenziell, aber nicht signifikant geringer. Histologisch war unter keiner der vier verwendeten Compound 21-Dosen eine signifikante Reduktion eingewanderter T-Zellen nachweisbar. Folglich zeigt der AT₂-Agonisten Compound 21 einen tendenziell antiinflammatorischen Effekt, welcher mangels Signifikanz jedoch nicht belegt werden kann.

5.3.2.1 Fazit

Trotz einer tendenziell nephroprotektiven Wirkung des selektiven AT₂-Agonisten Compound 21, welche teilweise auch signifikant war, kann diese anhand der Ergebnisse nicht endgültig bewiesen werden. Ursprünglich sollte das Modell der unilateralen Ureterobstruktion aufgrund der schnellen und einfachen Durchführbarkeit mit hoher Reproduzierbarkeit lediglich zur Findung der optimalen Dosis des AT₂-Agonisten in der Maus dienen. Diese sollte anschließend im Modell der renalen Ablation allein und in Kombination mit dem AT₁-Antagonisten Losartan auf eine nephroprotektive Wirkung hin geprüft werden.

Zum Zeitpunkt der hier gezeigten Versuche war das Modell der renalen Ablation in unserem Labor jedoch noch nicht ausgereift genug, um nephroprotektive Ansätze anhand dieses Modells untersuchen zu können. AT₂-Rezeptor-Defizienz führt jedoch auch im Modell der unilateralen Ureterobstruktion zu einer signifikanten Aggravation der Nierenschäden [46]. Sollte die Hypothese, dass selektive AT₂-Rezeptor-Stimulation antiinflammatorisch und antifibrotisch ist, korrekt sein, so müsste diese nephroprotektive Wirkung folglich auch im Modell der unilateralen Ureterobstruktion nachweisbar sein.

In der hydronephrotischen UUO-Niere von AT₂-Knockout-Mäuse wurde histologisch eine erhöhte interstitielle Kollagen- und auf mRNA-Ebene eine erhöhte α 1-Kollagen-Expression nachgewiesen. Zudem war die Anzahl von Fibro- und Myofibroblasten stärker erhöht als die in den Wildtyp-Mäusen. Morphologisch weisen die hydronephrotischen UUO-Nieren von AT₂-Knockout-Mäusen nach 5- oder 14-tägiger unilateraler Ureterobstruktion qualitativ stärkere interstitielle Veränderungen mit Verbreiterung des Interstitiums und Erhöhung der Zellzahl auf [46]. AT₂-Rezeptor-Defizienz verstärkt also die UUO-bedingte Verbreiterung des Interstitiums. Wir konnten hingegen zeigen, dass AT₂-Rezeptor-Stimulation mit der gemäß pharmakologischen Überlegungen idealen Dosis des selektiven AT₂-Agonisten Compound 21 den UUO-bedingten Anstieg des prozentualen Interstitiumanteils mit $p < 0,01$ signifikant reduziert. Der Vergleich von Wildtyp- mit AT₂-Knockout-Mäusen an Tag 5 und 14 nach unilateraler Ureterobstruktion zeigt keinen Unterschied bezüglich Zellproliferation und Monozyten-Infiltration [46]. Dies lässt vermuten, dass der AT₂-Rezeptor unter physiologischer Stimulation mit Angiotensin II kaum oder gar keinen Einfluss auf die Anzahl eingewanderter Monozyten hat. Die selektive AT₂-Rezeptor-Stimulation mit 2 und 10 mg Compound 21/kg Futter führte sowohl histologisch als auch auf mRNA-Ebene lediglich zu einer tendenziellen, jedoch nicht signifikanten Reduktion von eingewanderten Monozyten. Bezüglich der UUO-bedingten Einwanderung von T-Zellen in AT₂-Knockout-Mäusen sind keine Daten publiziert. Auch hier konnten wir keine signifikante Reduktion unter selektiver Stimulation des AT₂-Rezeptors nachweisen.

5.3.3 Positivkontrolle

Da die implizierte nephroprotektive Wirkung des selektiven AT₂-Agonisten Compound 21 anhand der Ergebnisse weder eindeutig verifiziert noch klar widerlegt werden kann, erfolgte eine Positivkontrolle mit dem AT₁-Antagonisten Losartan, dessen nephroprotektive Wirkung im Modell der unilateralen Ureterobstruktion in Ratten bereits nachgewiesen und publiziert wurde [33]. Um eine Über- oder Unterdosierung der Losartan-Dosis zu vermeiden, wurde eine Dosis von 500 mg Losartan/l Trinkwasser gewählt, bei der die Angiotensin I-Plasmaspiegel, die relative Renin-Expression und der histologische Renin-Score signifikant erhöht sind. Als zweite Positivkontrolle wurde der Renin-Inhibitor Aliskiren mit einer Dosis von 50 mg/kg KG verwendet, dem in diesem Modell noch keine nephroprotektive Wirkung nachgewiesen wurde. Da diese Positivkontrolle komplett negativ ausfiel, wurde auf weitere Versuchsdurchgänge zur Erhöhung der n-Zahl verzichtet.

Im Gegensatz zu der Therapie mit dem neuen selektiven AT₂-Agonisten Compound 21 senkte weder der AT₁-Antagonisten Losartan noch der Renin-Inhibitor Aliskiren den UUO-bedingten Anstieg des prozentualen Interstitiumanteils. Hinsichtlich der Inflammationsparameter führte weder die Therapie mit Losartan noch die mit Aliskiren zu einer signifikanten Reduktion der UUO-bedingten Einwanderung von Monozyten und T-Zellen in den Kortex der hydronephrotischen UUO-Niere. Und auch auf die relative PAI-1-Expression hatte die Blockade des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems keinen Einfluss. Folglich konnte auch unter der Therapie mit dem AT₁-Antagonisten Losartan an Tag 7 nach unilateraler Ureterobstruktion kein antiinflammatorischer, antifibrotischer und somit nephroprotektiver Effekt nachgewiesen werden. Der fehlende Effekt von Losartan und Aliskiren könnte auf eine Unterdosierung oder insuffiziente Applikation zurückzuführen sein. Dies ist aufgrund der Erhöhung der relativen mRNA-Expression von Renin, welche auf dem Wegfall des negativen Feedbacks beruht, und dem Nachweis von suffizienten Plasmaspiegeln jedoch auszuschließen. Zudem konnte ebenso wie im Hauptversuch gezeigt werden, dass das Modell an sich funktioniert hat.

5.3.3.1 Fazit

Auch die Therapie mit dem AT₁-Antagonisten Losartan, dessen nephroprotektive Wirkung im Modell der unilateralen Ureterobstruktion in der Ratte nachgewiesen ist, führte nach 7-tägiger unilateraler Ureterobstruktion in FVB-Mäusen zu keinem Benefit. Somit fällt die Positivkontrolle ebenfalls negativ aus.

Das Versuchsprotokoll muss überdacht werden.

Es wurde bereits von anderen Arbeitsgruppen gezeigt, dass eine 5- bis 7-tägige unilaterale Ureterobstruktion eine tubuläre Atrophie, eine Verdickung der tubulären Basalmembran, einen Anstieg interstitieller Kollagene mit einer Vergrößerung des Interstitiumanteils, eine Infiltration von Makrophagen und eine Proliferation interstitieller Fibroblasten mit sich bringt [47-50]. Die Proliferation des Tubulointerstitium beginnt bereits innerhalb des ersten Tages nach unilateraler Ureterobstruktion und erreicht nach 6 bis 9 Tagen ihren Höhepunkt, welcher bis Tag 15 plateauartig bestehen bleibt [49]. Der zeitabhängige Vergleich von Wildtyp- mit AT₁-Knockout-Mäusen in Hinblick auf die Einwanderung von Entzündungszellen, Fibrose, tubuläre Schäden und Apoptose 2, 4 und 7 Tage nach unilateraler Ureterobstruktion zeigt, dass AT₁-Rezeptor-Defizienz die Entstehung UUO-bedingter Schäden verlangsamt [51]. An Tag 7 nach unilateraler Ureterobstruktion zeigen Wildtyp- und AT₁-Knockout-Mäuse hingegen vergleichbare Schäden [51]. Dies würde auch erklären, weshalb die Positivkontrolle mit dem AT₁-Antagonisten Losartan und dem Renin-Inhibitor Aliskiren an Tag 7 nach unilateraler Ureterobstruktion negativ ausfiel. Das Ausschalten des AT₁-Rezeptors durch die Verwendung einer AT₁-Knockout-Maus oder durch AT₁-Rezeptor-Blockade mit einem AT₁-Antagonisten scheint somit lediglich im Frühstadium der unilateralen Ureterobstruktion einen Benefit zu bewirken. Folglich muss die Positivkontrolle mit einer kürzeren Obstruktionszeit wiederholt werden. Um ausschließen zu können, dass das UUO-Modell in FVB-Mäuse therapieresistent ist, wurde zudem der Mausstamm gewechselt.

In der Literatur werden am häufigsten C57BL/6-Mäuse verwendet. Deshalb wurde die Positivkontrolle mit verkürzter, 3-tägiger Obstruktionszeit in C57BL/6-Mäusen wiederholt (Daten wurden nicht gezeigt). Um den Versuch direkt mit den zuvor in FVB-Mäusen durchgeführten Experimenten vergleichen zu können, erfolgte die Organentnahme zweizeitig an Tag 3 und an Tag 7 nach unilateraler Ureterobstruktion. Es wurde gezeigt, dass Losartan und Aliskiren auch in C57BL/6-Mäusen an Tag 7 nach UUO zu keinem Benefit führen. An Tag 3 nach UUO war die relative mRNA-Expression des Chemokins MCP-1 unter der Therapie mit Losartan oder der mit Aliskiren tendenziell geringer als die in der nicht therapierten Versuchsgruppe. Ein antiinflammatorischer und antifibrotischer Effekt der Positivkontrolle scheint somit an Tag 3 nach UUO möglich, ist aufgrund der geringen n-Zahl jedoch nicht signifikant. Auf eine Erhöhung der n-Zahl in C57BL/6-Mäusen wurde jedoch zugunsten eines erneuten Versuchsdurchganges in den zuvor verwendeten FVB-Mäusen verzichtet.

5.3.5 Vorzeitige Organentnahme an Tag 3 nach UUO

Dieser abschließende Versuch sollte zeigen, ob UUO-bedingte Nierenschädigungen in der frühen Phase, also bereits an Tag 3 nach UUO, unter medikamentöser Therapie mit AT₁-Antagonist, Renin-Inhibitor oder selektivem AT₂-Agonist in FVB-Mäusen reduziert sind.

Ebenso wie im Hauptversuch und der Positivkontrolle konnte auch hier anhand der signifikanten Zunahme des prozentualen Interstitiumanteils, der relativen mRNA-Expression von PAI-1, MCP-1 und IP-10, sowie der Anzahl CD3- und F4/80-positiver Entzündungszellen belegt werden, dass die unilaterale Ureterobstruktion erfolgreich war. Die UUO-bedingte Verbreiterung des prozentualen Interstitiumanteils war nach 3-tägiger Ureterobstruktion unter keiner der Therapievarianten signifikant gesenkt. In dieser frühen Phase ist kein reduktiver Effekt des neuen selektiven AT₂-Agonisten Compound 21 nachweisbar. Sowohl die relative PAI-1-Expression als auch die von Fibronectin wurde durch die beiden Positivkontrollen gesenkt. Diese Reduktion war jedoch nur unter der Therapie mit 50 mg Aliskiren/kg KG mit $p < 0,05$ und $p < 0,01$ signifikant.

Auf mRNA-Ebene ist der Effekt des AT₂-Agonisten Compound 21 anhand der relativen Expression von PAI-1 und Fibronektin, bei geringer n-Zahl und einer großen Standardabweichung innerhalb der Gruppen, nicht beurteilbar. Unter der Therapie mit 50 mg Aliskiren/kg KG war die relative mRNA-Expression von MCP-1 mit $p < 0,05$ signifikant reduziert. Losartan führte hingegen zu keiner signifikanten Reduktion. Histologisch war die Anzahl F4/80-positiver Zellen in allen therapierten Versuchsgruppen erniedrigt. Eine ausreichende Aufnahme des AT₁-Antagonisten Losartan und des Renin-Inhibitors Aliskiren wurde anhand der erhöhten mRNA-Expression von Renin und dem Nachweis von suffizienten Plasmaspiegel bewiesen.

5.3.4.1 Fazit

Lediglich unter der Therapie mit dem Renin-Inhibitor Aliskiren war ein signifikanter antifibrotischer, antiinflammatorischer und somit nephroprotektiver Effekt nachweisbar. Anders als an Tag 7 nach UO führte der selektive AT₂-Agonist Compound 21 an Tag 3 nach UO zu keiner signifikanten Reduktion der UO-bedingten Interstitiumverbreiterung. Auf eine Erhöhung der n-Zahl in dieser frühen Phase wurde verzichtet. Während die Wirkung von ACE-Hemmern, AT₁-Antagonisten und des Renin-Inhibitors letztlich auf einer Nichtstimulation des AT₁-Rezeptors beruht, ist die Wirkung des AT₂-Agonisten eine andere. Deshalb stellt sich die Frage, ob sich diese Medikamente überhaupt als Positivkontrollen für den selektiven AT₂-Agonisten eignen. Im Vergleich von Wildtyp- mit AT₁-Knockout-Mäusen sind die UO-bedingten Schäden bereits an Tag 7 nach UO vergleichbar [51]. Im Vergleich von Wildtyp- mit AT₂-Knockout-Mäusen sind Unterschiede zwischen beiden Versuchsgruppen teilweise erst an Tag 14 nach UO signifikant [46]. Es wäre also denkbar, dass der AT₂-Agonist zu einem Zeitpunkt wirkt, an dem der AT₁-Antagonist bereits keinen Benefit mehr aufweist.

6. Zusammenfassung

Ziel der Arbeit war es zu überprüfen, ob die selektive Stimulation des AT₂-Rezeptors mit Compound 21 im Modell der unilateralen Ureterobstruktion antiinflammatorisch, antifibrotisch und somit nephroprotektiv wirkt. Anhand von Plasmaspiegeln haben wir erstmals zeigen können, dass der AT₂-Agonist Compound 21 Mäusen mit über 24 Stunden konstanten Plasmaspiegeln oral in Form von Spezialfutter suffizient appliziert werden kann. Nach Absetzen des Spezialfutters sind die Plasmaspiegel nach etwa fünf Stunden auf die Hälfte abgesunken. Eine Dosis von 2 mg/kg Futter müsste gemäß pharmakologischen Überlegungen der idealen Dosis entsprechen. Diese Dosis führte an Tag 7 nach UUO zu einer mit $p < 0,01$ signifikanten Reduktion der UUO-bedingten Verbreiterung des prozentualen Interstitiumanteils. Auf mRNA-Ebene war jedoch kein antifibrotischer und lediglich ein tendenziell antiinflammatorischer Effekt nachweisbar. Auch histologisch zeigte sich keine signifikante Reduktion eingewanderter Entzündungszellen. In FVB-Mäusen war an Tag 7 nach UUO weder unter der Therapie mit dem AT₁-Antagonisten Losartan noch unter der mit dem Renin-Inhibitor Aliskiren, welche als Positivkontrollen dienten, ein antiinflammatorischer oder antifibrotischer Effekt nachweisbar. Eine Unterdosierung oder mangelnde Aufnahme der Medikamente kann aufgrund der nachweisbaren Hemmung des negativen Feedbacks sowie dem sicheren Nachweis von Plasmaspiegeln ausgeschlossen werden. Zudem hat das Modell nachweislich funktioniert. Auch im häufig verwendeten C57BL/6-Mausstamm war an Tag 7 nach UUO kein Benefit der Positivkontrollen nachweisbar. Letztlich wurde gezeigt, dass der humane Renin-Inhibitor Aliskiren in der frühen Phase, an Tag 3 nach UUO, zu einem Benefit führt. Auf mRNA-Ebene ist die relative Expression von MCP-1 und PAI-1 mit $p < 0,05$ und die von Fibronektin mit $p < 0,01$ signifikant reduziert. Dieser antiinflammatorische und antifibrotische Effekt war unter der Therapie mit dem AT₁-Antagonisten Losartan lediglich tendenziell, jedoch nicht signifikant nachweisbar. Folglich verlangsamt die Therapie mit Aliskiren oder Losartan lediglich die Entstehung der UUO-bedingten Nierenschädigungen, so dass ein Benefit nur in der frühen Phase nachweisbar ist. Der AT₂-Agonist Compound 21 weist in dieser frühen Phase der Ureterobstruktion hingegen keinen überzeugenden Benefit auf.

Die zu überprüfende Hypothese, dass selektiver AT₂-Agonismus anti-inflammatorisch, antifibrotisch und somit nephroprotektiv ist, kann anhand der erhobenen Ergebnisse nicht endgültig bewiesen werden. Es wurde jedoch gezeigt, dass der neue selektive AT₂-Agonist Compound 21 Nierenschädigungen nach unilateraler Ureterobstruktion weder aggraviert noch eine nephrotoxische Wirkung aufweist.

6.1 Kritische Reflexion der Arbeit

Gutes wissenschaftliches Arbeiten beinhaltet, dass biologische Effekte, wie in diesem Fall die vermeintlich nephroprotektive Wirkung des selektiven AT₂-Agonisten Compound 21, durch mehrere Parameter abgesichert werden. Dabei muss die Plausibilität der Effekte überprüft werden. Deshalb haben wir zunächst anhand von Plasmaspiegeln eine suffiziente orale Applikation mit über 24 Stunden konstanten Plasmaspiegeln nachgewiesen sowie die gemäß pharmakologischen Überlegungen ideale Dosis von Compound 21 mit dem 10-fachen K_i-Wert anhand einer Dosiswirkungskurve ermittelt. In der vorliegenden Arbeit wurden die Versuche in Mäusen intensiv vorbereitet. Der nephroprotektive Effekt äußerte sich durch eine Reduktion der Interstitiumverbreiterung und war unter der theoretisch idealen Dosis von 2 mg/kg Futter zu beobachten. Dieser Parameter konnte jedoch nicht durch weitere signifikante Parameter wie zum Beispiel eine signifikante Reduktion der relativen mRNA-Expression von PAI-1 oder eine signifikant verminderte Einwanderung CD3- und F4/80-positiver Zellen ergänzt werden. Folglich konnten wir die Nephroprotektion nicht eindeutig belegen, so dass weitere Versuche notwendig sind, um die Hypothese abschließend verifizieren zu können. Dies würde jedoch den Umfang dieser Arbeit sprengen.

Gutes wissenschaftliches Arbeiten beinhaltet zudem die Verwendung einer Positivkontrolle. Mit dem AT₁-Antagonisten Losartan haben wir für die Positivkontrolle ein Medikament gewählt, welches bereits in Ratten in dem Modell der unilateralen Obstruktion als Positivkontrolle diente [34-35]. Ebenso wie vor der Applikation des selektiven AT₂-Agonisten haben wir auch für den AT₁-Antagonisten Losartan zunächst eine Dosis-Wirkungskurve erstellt, um eine suffiziente Applikation gewährleisten zu können.

Letztlich haben wir eine Dosis von 500 mg/l gewählt, bei der sowohl die Angiotensin I-Plasmaspiegel als auch die relative Renin-Expression und der histologische Renin-Score signifikant erhöht waren. Die Positivkontrolle führte in dem Modell der unilateralen Ureterobstruktion in den FVB-Mäusen zu keinem Benefit, so dass das Versuchsprotokoll selbstkritisch überdacht wurde. Dank der zuvor ermittelten Dosis-Wirkungskurve und dem Nachweis von Plasmaspiegeln kann an dieser Stelle eine insuffiziente Applikation als Ursache ausgeschlossen werden. Es wurde viel Wert darauf gelegt mögliche Fehlerquellen auszumachen, um diese nacheinander ausschalten zu können. Um eine Therapieresistenz des UUO-Modells in FVB-Mäusen ausschließen zu können, erfolgte ein erneuter Versuchsdurchgang in dem häufig verwendeten C57BL/6-Mausstamm sowie der zusätzliche Vergleich mit einem kürzeren Obstruktionszeitraum.

Als Selbstkritik ist an dieser Stelle anzumerken, dass bei Folgeversuchen im Vorfeld eine statistische Versuchsplanung erfolgen sollte. Durch Erhöhung der n-Zahl wären beispielsweise weiterführende statistische Testverfahren möglich gewesen, was sich positiv auf die Aussagekraft ausgewirkt hätte. Des Weiteren sollte anhand einer Kosten-Nutzen-Analyse eruiert werden, ob mikro-osmotische Pumpen einer oralen Applikation vorzuziehen sind. Trotz des Nachweises suffizienter Plasmaspiegel bei oraler Applikation von Compound 21 und Losartan, ist zu bedenken, dass die Aufnahme von der Trink- und Fressmenge abhängig ist, welche bei kranken Mäusen durchaus variieren kann. Mikro-osmotische Pumpen würden hingegen bei allen Mäusen eine gleichmäßig konstante Applikation gewährleisten.

Vor allem die 7-tägige unilaterale Ureterobstruktion führte zu derart starken, hydronephrotischen Veränderung der betroffenen Niere, dass eine immunhistologische Färbung zunächst keine akzeptablen Ergebnisse lieferte. Durch die gute kooperative und konstruktive Zusammenarbeit mit der Histologie gelang es aber die CD3- und F4/80-Färbung zu optimieren. Dennoch eignet sich das UUO-Modell nicht, um marginale antiinflammatorische Therapie-Effekte in der Spätphase histologisch nachzuweisen.

Bevor wir den AT₂-Agonisten allein und in Kombination mit dem AT₁-Antagonisten Losartan im Modell der renalen Ablation auf eine nephroprotektive Wirkung hin untersucht haben, hätte man zeigen müssen, dass das Modell so ausgereift ist, dass sich nach renaler Ablation randomisierte Gruppen ohne Therapie am Ende des Versuchsdurchganges nicht grundlegend unterscheiden. Denn nur bei einer vergleichbaren Ausgangssituation ist es möglich therapeutische Effekte nachzuweisen. Der große Vorteil dieses Modells ist die Möglichkeit anhand der Retentionsparameter Kreatinin und Harnstoff-N sowie der Albumin-Kreatinin-Ratio eine Aussage über die Nierenfunktion treffen zu können.

Letztlich stellt sich die Frage, ob der AT₁-Antagonist als Positivkontrolle für den AT₂-Agonisten Compound 21 geeignet ist. Während Antihypertensiva wie ACE-Hemmer, AT₁-Antagonisten und der Renin-Inhibitor letztlich alle die Angiotensin II-vermittelte Stimulation des AT₁-Antagonisten verhindern, beruht der AT₂-Agonist Compound 21 auf einer selektiven Stimulation des AT₂-Rezeptors. Dieser neue Ansatzpunkt der pharmakologischen Modulation des Renin-Angiotensin-Systems könnte aufgrund des konträren Wirkmechanismus durchaus eine zeitversetzte Wirkung im Vergleich zu den oben genannten Antihypertensiva aufweisen. Es wäre also durchaus denkbar, dass eine selektive Stimulation des AT₂-Rezeptors mit Compound 21 die implizierte antiinflammatorische, antifibrotische und somit nephroprotektive Wirkung zu einem Zeitpunkt entfaltet, an dem der AT₁-Antagonist keinen Benefit mehr aufweist. Dies würde auch erklären, weshalb Compound 21 nach 7-tägiger unilateraler Ureterobstruktion in FVB-Mäusen einen tendenziell nephroprotektiven Effekt aufweist, während der AT₁-Antagonisten Losartan und der Renin-Inhibitor Aliskiren in dieser späten Phase keinen Benefit zeigen. In der Studie von Kashina et al. bezüglich der kardioprotektiven Wirkung des selektiven AT₂-Agonisten Compound 21 war der Benefit ebenfalls an Tag 7 nach Intervention nachweisbar [14]. Während die Infarktgröße unter der Therapie mit Compound 21 signifikant reduziert war, zeigte sich unter der Therapie mit dem AT₁-Antagonisten Candesartan zu diesem Zeitpunkt ebenfalls lediglich eine tendenzielle Reduktion [14]. Trotz aller aufgezeigten Kritikpunkte hat diese Arbeit wichtige Grundlagen und Erkenntnisse für Folgeversuche geliefert.

7. Ausblick

7.1 Konsequenzen für Compound 21

Die Tatsache, dass AT_2 -Rezeptor-Defizienz Nierenschäden nach renaler Ablation aggraviert und zu erhöhter Mortalität führt [11], impliziert, dass AT_2 -Rezeptor-Stimulation antiinflammatorisch, antifibrotisch und somit nephroprotektiv wirkt. Dieser Umkehrschluss konnte im Rahmen dieser Dissertation jedoch nicht eindeutig bewiesen werden. Dennoch wurde gezeigt, dass der selektive AT_2 -Agonist Compound 21 die UUO-bedingten Nierenschäden weder aggraviert noch nephrotoxisch ist. Wie die tendenziell nephroprotektive Wirkung von Compound 21 nach 7-tägiger unilateraler Ureterobstruktion zu bewerten ist, muss durch weitere Versuche in einem anderen Modell überprüft werden.

Es wurde bereits publiziert, dass die Stimulation mit Compound 21 nach induziertem Stroke in spontan hypertensiven, Schlaganfall anfälligen Ratten (SHRSPs) zu einer signifikanten Reduktion des ischämischen Gebietes und der Mortalität führt [13]. Auch nach induziertem Myokardinfarkt in Wistar Ratten führt Compound 21 zu einem Benefit, welcher sich durch eine verbesserte diastolische und systolische Ventrikelfunktion und eine signifikant kleinere Infarktnarbe äußert. Die signifikante Reduktion von MCP-1 und MPO lassen zudem einen antiinflammatorischen Effekt des selektiven AT_2 -Agonisten vermuten [14]. Nach Abschluss der präklinischen Studien strebt das Center of Cardiovascular Research (CCR) (Charité, Berlin, Deutschland) in Zusammenarbeit mit dem Pharmaunternehmen Vicore Pharma (Göteborg, Schweden) die ersten klinischen Prüfungen an [52]. Sowohl die neuro- als auch die kardioprotektive Wirkung des selektiven AT_2 -Agonisten Compound 21 wurde in einem klinisch relevanten Ischämie-modell nachgewiesen. Folglich wäre es durchaus sinnvoll die vermutete nephroprotektive Wirkung von Compound 21 ebenfalls in einem Ischämie-Reperfusion-Modell zu prüfen. Letztlich sind Folgeversuche notwendig, um die Funktion des AT_2 -Rezeptors endgültig charakterisieren zu können.

7.2 Sinnvolle Folgeversuche

Die Signalkaskade, welche durch Stimulation des AT₂-Rezeptors aktiviert wird, ist weitestgehend unklar [53]. Es muss zunächst geprüft werden, in welcher Zeitspanne eine mögliche protektive Wirkung unter der Therapie mit Compound 21 nachweisbar ist und wann sie ihren Höhepunkt erreicht. Die Schwere der induzierten Nierenschädigung kann im Modell der unilateralen Ureterobstruktion durch Veränderung der Obstruktionsdauer variiert werden. Das Fenster, in dem eine therapeutische Wirkung nachweisbar ist, scheint aufgrund der Progressivität jedoch sehr gering zu sein. Deshalb wäre es sinnvoll die zeitabhängige Wirkung des AT₂-Agonisten erneut in einem Modell zu überprüfen, welches weniger progressiv ist. Hierfür würde sich das Modell der renalen Ablation eignen, bei dem eine Woche nach einer 2/3-Nephrektomie die komplette kontralaterale Niere entfernt wird. In diesem Modell hat unsere Arbeitsgruppe bereits gezeigt, dass AT₂-Rezeptor-Defizienz Nierenschäden nach renaler Ablation aggraviert und zu erhöhter Mortalität führt [11]. Im Umkehrschluss wurde vermutet, dass AT₂-Rezeptor-Stimulation antiinflammatorisch, antifibrotisch und somit nephroprotektiv ist. Zum Zeitpunkt der hier gezeigten Versuche war das Modell der renalen Ablation in unserem Labor jedoch noch nicht ausgereift genug, um nephroprotektive Ansätze anhand dieses Modells untersuchen zu können. Das Modell der reversiblen unilateralen Ureterobstruktion, welches zusätzlich eine Beurteilung der Regeneration UUO-bedingter Nierenschäden ermöglicht [54], stellt eine Alternative zum Modell der renalen Ablation dar. Das Modell der reversiblen Ureterobstruktion zeichnet sich dadurch aus, dass zur Obstruktion des Ureters ein Klipp verwendet wird, welcher nach 6-tägiger unilateraler Ureterobstruktion wieder entfernt wird. Nach 7-tägiger Erholungsphase erfolgt dann die Nephrektomie der kontralateralen Niere [55]. Um die implizierte, antiinflammatorische und antifibrotische Wirkung des selektiven AT₂-Agonisten Compound 21 abschließend verifizieren oder eindeutig widerlegen zu können, ermöglicht dieses Modell eine zeitabhängige Beurteilung unter Berücksichtigung der Regeneration der UUO-bedingten Nierenschädigungen.

8. Abkürzungsverzeichnis

Δ	delta
°C	Grad Celsius
ACE	engl. Angiotensin Converting Enzyme
AT ₁ -Rezeptor	Angiotensin-II-Rezeptor-Subtyp-1
AT ₂ -Rezeptor	Angiotensin-II-Rezeptor-Subtyp-2
BPP _{5a}	Bradikinin potenzierendes Pentapeptid 5 α
C21	Compound 21 (AT ₂ -Agonist)
C57BL/6	häufig verwendeter Mausstamm
cAMP	engl. cyclic Adenosin 3',5' monophosphat
cDNA	engl. cyclic Desoxynucleic Acid
CT	engl. Cycle Threshold
dB	Dezibel; Einheit des Pegelmaßes
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamin-tetraacetat
ENaC	epithelialer Natriumkanal
Eppi	Reaktionsgefäß der Firma Eppendorf
EtOH	Ethanol
FVB	Mausstamm
Fw	forward
g	(1) Gramm, (2) Erdbeschleunigung
G _{αi} -Protein	α -Untereinheit eines inhibitorischen G-Proteins
h	Stunde
HCL	Salzsäure
H ₂ O	Wasser
IP-10	Interferon induzierbares Protein 10
kD	Kilodalton
KG	Körpergewicht
kg	Kilogramm
K _i	Bindungskonstante
l	Liter
lat.	lateinisch

lux	Einheit der Beleuchtungsstärke
MCP-1	engl. monocyte chemoattractant protein 1
min	Minute
ml	Milliliter
µl	Mikroliter
MLV-RT	engl. Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase
mg	Milligramm
MPO	Myeloperoxidase
mRNA	engl. messenger Ribonucleic Acid
NaCl	Natriumchlorid
O ₂	Sauerstoff
PAS	engl. Periodic acid-Schiff reaction
p-Wert	engl. probability; Signifikanzwert
PAI-1	Plasminogen-Aktivator-Inhibitor-1-Protein
PhD	lat. philosophiae doctor
PBS	engl. phosphate buffered saline
PCR	engl. polymerase chain reaction
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
Rev	engl. reverse
RNA	engl. Ribonucleic Acid
RNase	RNA spaltende Nuklease
rpm	engl. rounds per minute
rRNA	engl. ribosomal Ribonucleic Acid
s	Sekunde
SHRSP	engl. spontaneously Hypertensive Stroke Prone rat
T-Base	Programm zur Verwaltung der Versuchsmäuse
TBS	engl. Tris-buffered saline
TCR	T-Zell-Rezeptor
t-PA	engl. Tissue Plasminogen Activator
UKE	Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf
UK	engl. United Kingdom
u-PA	engl. Urokinase-type Plasminogen Activator
USA	engl. United States of America
UUO	unilaterale Ureterobstruktion

9. Literaturverzeichnis

1. Vázquez E, Coronel I, Bautista R, Romo E, Villalón CM, Avila-Casado MC, Soto V, Escalante B (2005) *Angiotensin II-dependent induction of AT(2) receptor expression after renal ablation*. Am J Physiol Renal Physiol. **288**(1): 207-213.
2. Siragy HM, Carey RM (1999) *Protective role of the angiotensin AT2 receptor in a renal wrap hypertension model*. Hypertension. **33**(5): 1237-1242.
3. Zhang SL, Guo J, Moini B, Ingelfinger JR (2004) *Angiotensin II stimulates Pax-2 in rat kidney proximal tubular cells: impact on proliferation and apoptosis*. Kidney Int. **66**(6): 2181-2192.
4. Siddiqui AH, Ali Q, Hussain T (2009) *Protective role of angiotensin II subtype 2 receptor in blood pressure increase in obese Zucker rats*. Hypertension. **53**(2): 256-261.
5. Lanz B, Kadereit B, Ernst S, Shojaati K, Causevic M, Frey BM, Frey FJ, Mohaupt MG (2003) *Angiotensin II regulates 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 via AT2 receptors*. Kidney Int. **64**(3): 970-977.
6. Cao Z, Bonnet F, Candido R, Nesteroff SP, Burns WC, Kawachi H, Shimizu F, Carey RM, De Gasparo M, Cooper ME (2002) *Angiotensin type 2 receptor antagonism confers renal protection in a rat model of progressive renal injury*. J Am Soc Nephrol. **13**(7): 1773-1787.
7. Friberg P, Sundelin B, Bohman SO, Bobik A, Nilsson H, Wickman A, Gustafsson H, Petersen J, Adams MA (1994) *Renin-angiotensin system in neonatal rats: induction of a renal abnormality in response to ACE inhibition or angiotensin II antagonism*. Kidney Int. **45**(2): 485-492.
8. Esteban V, Ruperez M, Vita JR, López ES, Mezzano S, Plaza JJ, Egido J, Ruiz-Ortega M (2003) *Effect of simultaneous blockade of AT1 and AT2 receptors on the NFkappaB pathway and renal inflammatory response*. Kidney Int Suppl. (86): S33-38.

9. Wolf G, Wenzel U, Burns KD, Harris RC, Stahl RA, Thaiss F (2002) *Angiotensin II activates nuclear transcription factor-kappaB through AT1 and AT2 receptors*. *Kidney Int.* **61**(6): 1986-1995.
10. Cervenka L, Heller J, Jelínek F (1996) *Lack of a beneficial effect of PD123319, an AT2-angiotensin receptor antagonist, on the course of ablation nephropathy in the rat*. *Kidney Blood Press Res.* **19**(5): 241-244.
11. Benndorf RA, Krebs C, Hirsch-Hoffmann B, Schwedhelm E, Cieslar G, Schmidt-Haupt R, Steinmetz OM, Meyer-Schwesinger C, Thaiss F, Haddad M, Fehr S, Heilmann A, Helmchen U, Hein L, Ehmke H, Stahl RA, Böger RH, Wenzel UO (2009) *Angiotensin II type 2 receptor deficiency aggravates renal injury and reduces survival in chronic kidney disease in mice*. *Kidney Int.* **75**(10): 1039-1049.
12. Wan Y, Wallinder C, Plouffe B, Beaudry H, Mahalingam AK, Wu X, Johansson B, Holm M, Botoros M, Karlén A, Pettersson A, Nyberg F, Fändriks L, Gallo-Payet N, Hallberg A, Alterman M (2004) *Design, synthesis, and biological evaluation of the first selective nonpeptide AT2 receptor agonist*. *J Med Chem.* **47**(24): 5995-6008.
13. Gelosa P, Pignieri A, Fändriks L, de Gasparo M, Hallberg A, Banfi C, Castiglioni L, Turolo L, Guerrini U, Tremoli E, Sironi L (2009) *Stimulation of AT2 receptor exerts beneficial effects in stroke-prone rats: focus on renal damage*. *J Hypertens.* **27**(12): 2444-2451.
14. Kashina E, Grzesiak A, Li J, Foryst-Ludwig A, Timm M, Rompe F, Sommerfeld M, Kemnitz UR, Curato C, Namsolleck P, Tschöpe C, Hallberg A, Alterman M, Hucko T, Paetsch I, Dietrich T, Schnackenburg B, Graf K, Dahlöf B, Kintscher U, Unger T, Steckelings UM (2008) *Angiotensin II Type 2 Receptor Stimulation. A Novel Option of Therapeutic Interference With the Renin Angiotensin System in Myocardial Infarction?* *Circulation.* **118**(24): 2523-2532.

15. Ruiz-Ortega M, Esteban V, Suzuki Y, Ruperez M, Mezzano S, Ardiles L, Justo P, Ortiz A, Egido J (2003) *Renal expression of angiotensin type 2 (AT2) receptors during kidney damage*. *Kidney Int Suppl.* (86): S21-26.
16. Skeggs LT Jr, Marsh WH, Kahn JR, Shumway NP (1954) *The existence of two forms of hypertensin*. *J Exp Med.* **99**(3): 275 –282.
17. Ng KKF, Vane JR (1967) *Conversion of angiotensin I to angiotensin II*. *Nature.* **216**: 762-766.
18. Ondetti MA, Rubin B, Cushman DW (1977) *Design of specific inhibitors of angiotensin-converting enzyme: new class of orally active antihypertensive agents*. *Science.* **196**(4288): 441-444.
19. Wong PC, Chiu AT, Price WA, Thoolen MJMC, Carini DJ, Johnson AL, Taber RI, Timmermans PBMWM (1988) *Nonpeptide angiotensin II receptor antagonists: I. Pharmacological characterization of 2-n-butyl-4-chloro-1-(2-chlorobenzyl) imidazole-5-acetic acid, sodium salt (S-8307)*. *Pharmacol Exp Ther.* **247**: 1-7.
20. ONTARGET Investigators, Yusuf S, Teo KK, Pogue J, Dyal L, Copland I, Schumacher H, Dagenais G, Sleight P, Anderson C (2008) *Telmisartan, Ramipril, or Both in Patients at High Risk for Vascular Events*. *N Engl J Med.* **358**(15): 1547-1558.
21. Mann JF, Schmieder RE, McQueen M, Dyal L, Schumacher H, Pogue J, Wang X, Maggioni A, Budaj A, Chaithiraphan S, Dickstein K, Keltai M, Metsärinne K, Oto A, Parkhomenko A, Piegas LS, Svendsen TL, Teo KK, Yusuf S; ONTARGET investigators (2008) *Renal outcomes with telmisartan, ramipril, or both, in people at high vascular risk (the ONTARGET study): a multicentre, randomised, double-blind, controlled trial*. *Lancet.* **372** (9638): 547-553.
22. Wiggins KJ, Kelly DJ (2009) *Aliskiren: a novel renoprotective agent or simply an alternative to ACE inhibitors?* *Kidney Int.* **76**(1): 23-31.

23. Lenkei Z, Palkovits M, Corvol P, Llorens-Cortès C (1997) *Expression of angiotensin type-1 (AT1) and type-2 (AT2) receptor mRNAs in the adult rat brain: a functional neuroanatomical review*. *Front Neuroendocrinol.* **18**(4): 383-439.
24. Tsutsumi K, Saavedra JM (1991) *Characterization and development of angiotensin II receptor subtypes (AT1 and AT2) in rat brain*. *Am J Physiol.* **261**(1 Pt 2): R209-16.
25. Grady EF, Sechi LA, Griffin CA, Schambelan M, Kalinyak JE (1991) *Expression of AT2 receptors in the developing rat fetus*. *J Clin Invest.* **88**(3): 921-33.
26. Nio Y, Matsubara H, Murasawa S, Kanasaki M, Inada M (1995) *Regulation of gene transcription of angiotensin II receptor subtypes in myocardial infarction*. *J Clin Invest.* **95**(1): 46-54.
27. Abadir PM, Carey RM, Siragy HM (2003) *Angiotensin AT2 receptors directly stimulate renal nitric oxide in bradykinin B2-receptor-null mice*. *Hypertension.* **42**(4): 600-604.
28. Viswanathan M, Saavedra JM (1992) *Expression of angiotensin II AT2 receptors in the rat skin during experimental wound healing*. *Peptides.* **13**(4): 783-786.
29. Buisson B, Bottari SP, de Gasparo M, Gallo-Payet N, Payet MD (1992) *The angiotensin AT2 receptor modulates T-type calcium current in non-differentiated NG108-15 cells*. *FEBS Lett.* **309**(2): 161-164.
30. Laflamme L, Gasparo M, Gallo JM, Payet MD, Gallo-Payet N (1996) *Angiotensin II induction of neurite outgrowth by AT2 receptors in NG 108-15 cells. Effect counteracted by the AT1 receptors*. *J Biol Chem.* **271**(37): 22729-22735.
31. Jones EA, Shahed A, Shoskes DA (2000) *Modulation of apoptotic and inflammatory genes by bioflavonoids and angiotensin II inhibition in ureteral obstruction*. *Urology.* **56**(2): 346-351.

32. Pimentel JL Jr, Sundell CL, Wang S, Kopp JB, Montero A, Martínez-Maldonado M (1995) *Role of angiotensin II in the expression and regulation of transforming growth factor-beta in obstructive nephropathy*. *Kidney Int.* **48**(4): 1233-1246.
33. Kellner D, Chen J, Richardson I, Seshan SV, El Chaar M, Vaughan ED Jr, Poppas D, Felsen D (2006) *Angiotensin receptor blockade decreases fibrosis and fibroblast expression in a rat model of unilateral ureteral obstruction*. *J Urol.* **176**(2): 806-812.
34. Zuo C, Xie XS, Qiu HY, Deng Y, Zhu D, Fan JM (2009) *Astragalus mongholicus ameliorates renal fibrosis by modulating HGF and TGF-beta in rats with unilateral ureteral obstruction*. *J Zhejiang Univ Sci B.* **10**(5): 380-390.
35. Xie XS, Liu HC, Yang M, Zuo C, Deng Y, Fan JM (2009) *Ginsenoside Rb1, a panoxadiol saponin against oxidative damage and renal interstitial fibrosis in rats with unilateral ureteral obstruction*. *Chin J Integr Med.* **15**(2): 133-40.
36. Rerolle JP, Hertig A, Nguyen G, Sraer JD, Rondeau EP (2000) *Plasminogen activator inhibitor type 1 is a potential target in renal fibrogenesis*. *Kidney Int.* **58**(5): 1841-1850.
37. Wenzel U, Schneider A, Valente AJ, Abboud HE, Thaiss F, Helmchen UM, Stahl RA (1997) *Monocyte chemoattractant protein-1 mediates monocyte/macrophage influx in anti-thymocyte antibody-induced glomerulonephritis*. *Kidney Int.* **51**(3): 770-776.
38. Kitagawa K, Wada T, Furuichi K, Hashimoto H, Ishiwata Y, Asano M, Takeya M, Kuziel WA, Matsushima K, Mukaida N, Yokoyama H (2004) *Blockade of CCR2 ameliorates progressive fibrosis in kidney*. *Am J Pathol.* **165**(1): 237-246.
39. Panzer U, Panzer U, Steinmetz OM, Paust HJ, Meyer-Schwesinger C, Peters A, Turner JE, Zahner G, Heymann F, Kurts C, Hopfer H, Helmchen U, Haag F, Schneider A, Stahl RA (2007) *Chemokine*

- receptor CXCR3 mediates T cell recruitment and tissue injury in nephrotoxic nephritis in mice.* J Am Soc Nephrol. **18**(7): 2071-2084.
40. Ishola DA Jr, van der Giezen DM, Hahnel B, Goldschmeding R, Kriz W, Koomans HA, Joles JA (2006) *In mice, proteinuria and renal inflammatory responses to albumin overload are strain-dependent.* Nephrol Dial Transplant. **21**(3): 591-597.
 41. Kren S, Hostetter TH (1999) *The course of the remnant kidney model in mice.* Kidney Int. **56**(1): 333-337.
 42. Rumberger B, Vonend O, Kreutz C, Wilpert J, Donauer J, Amann K, Rohrbach R, Timmer J, Walz G, Gerke P (2007) *cDNA Mikroarray Analysis of Adaptive Changes after Renal Ablation in a Sclerosis-Resistant Mouse Strain.* Kidney Blood Press Res. **30**(6): 377-387.
 43. Henderson NC, Mackinnon AC, Farnworth SL, Kipari T, Haslett C, Iredale JP, Liu FT, Hughes J Sethi T (2008) *Galectin-3 Expression and Secretion Links Macrophages to the Promotion of Renal Fibrosis.* Am J Pathol. **172**(2): p. 288-298.
 44. Menke J, Iwata Y, Rabacal WA, Basu R, Yeung YG, Humphreys BD, Wada T, Schwarting A, Stanley ER, Kelley VR (2009) *CSF-1 signals directly to renal tubular epithelial cells to mediate repair in mice.* J Clin Invest. **119**(8): 2330–2342.
 45. Kipari T, Cailhier JF, Ferenbach D, Watson S, Houlberg K, Walbaum D, Clay S, Savill J, Hughes J (2006) *Nitric Oxide Is an Important Mediator of Renal Tubular Epithelial Cell Death in Vitro and in Murine Experimental Hydronephrosis.* Am J Pathol. **169**(2): 388-399.
 46. Ma J, Nishimura H, Fogo A, Kon V, Inagami T, Ichikawa I (1998) *Accelerated fibrosis and collagen deposition develop in the renal interstitium of angiotensin type 2 receptor null mutant mice during ureteral obstruction.* Kidney Int. **53**(4): 937-944.
 47. Nagle RB, Bulger RE (1978) *Unilateral obstructive nephropathy in the rabbit. II. Late morphologic changes.* Lab Invest. **38**(3): 270-278.

48. Sharma AK, Mauer SM, Kim Y, Michael AF (1993) *Interstitial fibrosis in obstructive nephropathy*. *Kidney Int.* **44**: 774-788.
49. Truong LD, Petrussevska G, Yang G, Gurpinar T, Shappell S, Lechago J, Rouse D, Suki WN (1996) *Cell apoptosis and proliferation in experimental chronic obstructive uropathy*. *Kidney Int.* **50**(1): 200-207.
50. Ishidoya S, Morrissey J, McCracken R, Reyes A, Klahr S (1995) *Angiotensin II receptor antagonist ameliorates renal tubulointerstitial fibrosis caused by unilateral ureteral obstruction*. *Kidney Int.* **47**(5): 1285-1294.
51. Esteban V, Lorenzo O, Rupérez M, Suzuki Y, Mezzano S, Blanco J, Kretzler M, Sugaya T, Egido J, Ruiz-Ortega M (2004) *Angiotensin II, via AT1 and AT2 receptors and NF-kappaB pathway, regulates the inflammatory response in unilateral ureteral obstruction*. *J Am Soc Nephrol.* **15**(6): 1514-29.
52. Unger T, Forschungsprojekt: Präklinische Medikamentenentwicklung. Charité, Berlin [Online im Internet] URL: http://pharmakologie.charite.de/forschung/ag_unger/#c87560 [Stand: 15.5.2011, 16:16].
53. Miura S, Matsuo Y, Kiya Y, Karnik SS, Saku K (2010) *Molecular mechanisms of the antagonistic action between AT1 and AT2 receptors*. *Biochem Biophys Res Commun.* **391**(1): 85-90.
54. Chevalier RL, Forbes MS, Thornhill BA (2009) *Ureteral obstruction as a model of renal interstitial fibrosis and obstructive nephropathy*. *Kidney Int.* **75**(11): 1145-1152.
55. Puri TS, Shakaib MI, Chang A, Mathew L, Olayinka O, Minto A, Sarav M, Hack BK, Quigg RJ (2010) *Chronic kidney disease induced in mice by reversible unilateral ureteral obstruction is dependent on genetic background*. *Am J Physiol Renal Physiol.* **298**(4): F1024–F1032.

10. Danksagung

Diese Arbeit wurde in der experimentellen Nephrologie (III. Med. Klinik, UKE) unter der Betreuung von Prof. Dr. med. Ulrich Wenzel angefertigt.

- Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater, Prof. Dr. med. Ulrich Wenzel, dessen ausgezeichnete Betreuung, Forderung und Förderung entscheidend zum Gelingen dieser Dissertation beitrugen.
- Den Initiatoren des Graduiertenkollegs „Entzündung und Regeneration“ 2008/2009, sowie Prof. Dr. med. Rolf A. K. Stahl (Direktor der III. Med. Klinik, UKE) danke ich dafür, dass sie mir ermöglicht haben diese Dissertation als Stipendiatin anzufertigen.
- Für die exzellente Einarbeitung im Labor möchte ich vor allem Dr. rer. nat. Gunther Zahner, Saskia Schröder und Anett Peters danken.
- Bei Dr. med. Christian Krebs und cand. med. Robin Schmidt-Haupt bedanke ich mich für die Durchführung der operativen Eingriffe.
- Cand. med. Alexandra Hölzel danke ich für die gegenseitige Unterstützung im Labor, Tierstall und bei der histologischen Auswertung.
- Dank gilt auch den internen und externen Kooperationspartnern:
Dr. med. Edzard Schwedhelm (Institut für experimentelle und klinische Pharmakologie, UKE) für die Bestimmung der Plasmaspiegel,
Dr. med. Munif Haddad (Institut für klinische Chemie, UKE) stellvertretend für die Bestimmung von Kreatinin und Harnstoff-N,
PhD Jan Danser (Institut für Pharmakologie, Erasmus University Rotterdam) für die Bestimmung der Angiotensin I-Plasmaspiegel,
PhD Harry van Goor und Anne-Roos Frenay (Institut für Pathologie, University Medical Center Groningen) für die Renin-Färbungen.
- Für die Anfertigung der histologischen Schnitte und die immunhistochemischen Färbungen danke ich Mariola Rezska.
- Eik Vettorazzi (Institut für Biometrie und Epidemiologie, UKE) danke ich für die biometrische Beratung bei kleinen n-Zahlen.
- Dank gilt auch dem Fachpersonal der Versuchstierhaltung (VTH, UKE).
- Zu guter Letzt möchte ich meiner Familie und Nikolaus Desai für die aufmunternden Worte in schwierigen Phasen sowie die seelische Unterstützung bei der Anfertigung dieser Dissertation herzlich danken.

11. Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Dissertation nicht veröffentlicht.

12. Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere ausdrücklich,
dass ich die Arbeit selbständig 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 kenntlich gemacht 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.

Jana Maren Baucke