

Universitätskrankenhaus Hamburg Eppendorf

Zentrum für Innere Medizin

Medizinische Klinik III.

Direktor: Professor Dr. med. Rolf A.K. Stahl

**Neue Strategien zur Prophylaxe der ACE – Hemmer
induzierten Schädigung der stenosierten Niere
bei renovaskulärer Hypertonie**

Dissertation zum Erlangen des Doktorgrades
des Fachbereiches Medizin der Universität Hamburg

Vorgelegt von
Mathias Weber

Hamburg, Mai 2012

Angenommen von der Medizinischen Fakultät
der Universität Hamburg am:

Veröffentlicht mit der Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität Hamburg am: am 16.08.2012

Prüfungsausschuss, Vorsitzender: Prof. Dr. U. Wenzel
Prüfungsausschuss, 1. Gutachter: Prof. Dr. F. Thaiss
Prüfungsausschuss, 2. Gutachter: PD. Dr. E. Schwedhelm

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1. Einleitung	
1.1 Chronisch progressive Nierenerkrankungen	3
1.2 Die Rolle von Renin	4
1.3 Von Angiotensin-I zu Angiotensin-II	5
1.4 Das Mineralkortikoid Aldosteron	5
1.5 Die Goldblatt Hypertonie	6
1.6 Angiotensin-Konversionsenzym-Hemmer (ACE)	6
1.7 Der Aldosteronantagonist Eplerenone	7
1.8 Das Decoypeptid	8
1.9 Ziele der Doktorarbeit	9
2. Methoden	
2.1 Tierhaltung und Ernährung	10
2.2 Die Clip-Operation	10
2.3 Das Blutdruckmessen	10
2.4 Die Tiergruppen	11
2.5 Die Urinanalyse	11
2.6 Die renale Funktion	11
2.7 Die Organentnahme	12
2.8 Die Präparation von Total RNA und Real time PCR	12
2.9 Die renale Morphologie	12
2.10 Die Immunhistochemie	13
2.11 Bestimmung von Prorenin und Renin	13
2.12 Statistische Analyse	13
3. Ergebnisse	
Enalapril vs. Decoypeptid	
3.1 Generelle Charakteristika Enalapril vs. Decoypeptid	14
3.2 Relatives Herz- und Nierengewicht	15
3.3 Die Blutdruckmessung unter Therapie	16
3.4 Die Nierenfunktion	17
3.5 Renal-morphologische Veränderungen in PAS Nierenschnitten	18
3.6 Fibrotische und interstitielle Veränderungen der Niere	19
3.7 Veränderungen der Prorenin und Renin Plasmakonzentration	20
3.8 Bestimmung der Renin und Renin Rezeptor Expression	22
Enalapril vs. Eplerenone	
3.9 Generelle Charakteristika Enalapril vs. Eplerenone	23
3.10 Die Blutdruckmessung unter sechswöchiger Therapie	24
3.11 Die Nierenfunktion und Aldosteronkonzentration	25
3.12 Organveränderungen	27
3.13 Nierengewicht und glomeruläre Größe	28
3.14 Morphologische Veränderungen der stenosierten Niere	29
3.15 Interstitielle und tubuläre Veränderungen der Niere	30
3.16 Entzündung und Fibrose in der Niere	31
3.17 Immunhistochemische Veränderungen der Niere	33

4. Diskussion	35
5. Zusammenfassung	38
6. Literaturverzeichnis	39
7. Danksagung	44
8. Eidesstattliche Versicherung	45
9. Lebenslauf	46

1. Einleitung

1.1 Chronisch progressive Nierenerkrankungen

Der arterielle Bluthochdruck ist ein wesentlicher Risikofaktor für das Entstehen chronischer Nierenerkrankungen (70). Die Prävalenz in den westlichen Industrienationen, einen arteriellen Bluthochdruck zu entwickeln, beträgt bei den über 50-jährigen 60% (67). Da mit einer global steigenden Lebenserwartung zu rechnen ist, wird es auch zu einer zunehmenden Anzahl von Patienten kommen, die an einer chronisch progressiven Nierenerkrankung leiden und das Stadium der finalen Nierenerkrankung erreichen. Dabei hat vor allem die medikamentöse Blockade des Renin-Angiotensin-Systems (RAS) einen positiven Einfluss auf chronische Nierenerkrankungen und gilt als fest etablierte Therapie (69, 74). Durch Hemmung der Umwandlung von Angiotensin-I in Angiotensin-II mit einem Angiotensin-Konversionsenzym-Hemmer (ACE-Hemmer) kann die profibrotische Wirkung von Angiotensin-II blockiert werden (74) und durch Blutdrucksenkung ein additiver nephroprotektiver Effekt erzielt werden (1).

Kommt es allerdings zu einer Nierenarterienstenose, erzeugt eine Blutdrucksenkung einen Schaden in der stenosierten Niere, welche bis zum Nierenversagen führen kann (22, 25, 71), während es in der nichtstenosierten Niere durch die Blutdrucksenkung zu geringerem Hochdruckschaden kommt (68). Über die zugrunde liegenden Mechanismen und Mediatoren der Schädigung der stenosierten Niere ist noch wenig bekannt. Kann die Nierenarterienstenose mit Standard-Untersuchungsmethoden relativ einfach diagnostiziert werden, stellt die Stenose der kleinen intrarenalen Gefäße bei Nephrosklerose eine weitaus größere diagnostische und therapeutische Herausforderung dar (79).

Vor kurzem wurde ein Reninrezeptor entdeckt, der sowohl Prorenin als auch Renin bindet (35). Da Prorenin und Renin mit gleicher Affinität gebunden werden, erhielt er den Namen (Pro)Renin-Rezeptor. Bindet Renin auf den (Pro)Renin-Rezeptor, wird die enzymatische Aktivität von Renin gesteigert. Es ist bekannt, dass Angiotensin-II über den AT1-Rezeptor an profibrotischen Umbauvorgängen in der Niere beteiligt ist (74). Möglicherweise spielt Renin durch Bindung auf den (Pro)Renin-Rezeptor eine Rolle in der Angiotensin-II vermittelten profibrotischen Signalkaskade (7, 51). Durch Einsatz eines ACE-Hemmers oder eines Angiotensin-I Antagonisten kann man die schädliche Wirkung von Angiotensin-II auf die Niere hemmen (52, 53). Trotzdem kommt es unabhängig von Angiotensin-II zu Fibrose in der stenosierten Niere (18). Unsere Arbeitsgruppe hat in vorangegangenen Arbeiten nachgewiesen, dass es in der stenosierten Niere zu einer vermehrten Konzentration von Renin und einer Hochregulation des (Pro)Renin-Rezeptors kommt (25). Möglicherweise kommt es durch Bindung von Renin an den (Pro)Renin-Rezeptor zu profibrotischen Umbauvorgängen (18).

Aber nicht nur die Bindung von Renin auf den (Pro)Renin-Rezeptor scheint an profibrotischen Signalkaskaden beteiligt zu sein. Auch Prorenin hat möglicherweise einen erheblichen Anteil an der Entstehung von renalen Schäden (19, 20) und spielt eine Rolle in der Ausbildung von diabetischen Komplikationen (73). Durch Einsatz eines Decoypeptid, welches die nicht proteolytische Aktivierung des Prorenins durch den (Pro)Renin-Rezeptor inhibiert (21), konnte in einigen Arbeiten ein deutlich verringerter Schaden der Niere festgestellt werden (66). Das Decoypeptid besteht aus 10 Aminosäuren und ist identisch mit dem Prorenin Prosegment, welches „handle region“ genannt wird und die nicht proteolytische Aktivierung durch den (Pro)Renin-Rezeptor steuert (21).

1.2 Die Rolle von Renin

In den Granulazellen des juxtaglomerulären Apparates im afferenten Schenkel der Nierenarteriolen wird Renin, welches selbst eigentlich kein Hormon, sondern ein proteolytische Enzym ist, gebildet (41). Renin besteht aus zwei homologen Lappen, das verbindende Zentrum ist mit zwei Aspartat Gruppen katalytisch aktiv (56). Die enzymatisch inaktive Vorstufe des aktiven Renins heißt Prorenin und ist mit einem N-terminalen Propeptid ausgestattet. Durch das N-terminale Propeptid wird das enzymatisch aktive katalytische Zentrum inaktiviert. Prorenin wird über zwei verschiedene Wege aktiviert: Proteolytisch und nichtproteolytisch (10). Die Serumkonzentration von Renin und Prorenin korreliert, weist aber auch Unterschiede auf (9): Akute Stimulationen auf Renin haben keinen Effekt auf die Proreninkonzentration, chronische Stimulation dagegen führt zu einer Konzentrationssteigerung, sowohl von Renin als auch Prorenin (64). Dies lässt den Schluss zu, dass Renin als aktives Enzym gespeichert und bei Stimulation des juxtaglomerulären Apparates freigesetzt werden kann. Prorenin dagegen wird kontinuierlich freigesetzt, ohne akute Rückkopplung auf eine akute Stimulation, allerdings in einer Plasmakonzentration, die das 100-fache der Renin Konzentration übersteigt (10).

Chronische Stimulation führt schließlich zu einer verstärkten katalytischen Umwandlung von Prorenin zu Renin, bei insgesamt erhöhter Konzentration von Prorenin und Renin im Serum (9). Stimulation zur Prorenin und Reninproduktion ist zunächst der arterielle Blutdruck. Dabei registrieren renale Drucksensoren (Barosensoren) den Blutdruck im afferenten Schenkel (62, 63) und reagieren auf Druckabfall der Nierenarterie innerhalb von Bruchteilen einer Minute. Dabei muss ein gewisser unterer Schwellenwert von unter 90mmHg erreicht sein, damit es zur Reninfreisetzung kommt. Oberhalb des Schwellenwertes, zwischen 90mmHg und 180mmHg, reguliert die Niere selbstständig per Gefäßdilatation und -vasokonstriktion durch Sympathikusaktivität die Durchblutung.

Ebenfalls einen direkten Einfluss hat das zentrale Nervensystem auf die Reninsekretion, welches über sympathische Nervenfasern vermittelt wird, die im juxtaglomerulären Apparat und an den Vasa afferentia enden. Durch Noradrenalin kommt es über Aktivierung von β 1-Rezeptoren zu einer Reninfreisetzung. Auch Salz- und Volumenmangel induziert eine vermehrte Sekretion von Renin (31, 57). Das in den systemischen Kreislauf freigesetzte Renin spaltet von dem aus der Leber stammende Angiotensinogen, ein α 2-Globulin, das Dekapeptid Angiotensin-I ab.

1.3 Von Angiotensin-I zu Angiotensin-II

Angiotensin-I wird durch das im Blut und in der Lunge vorhandene Angiotensin-Converting-Enzym (ACE) durch weitere hydrolytische Abspaltung zum aktiven Oktapeptid Angiotensin-II. Die Halbwertszeit von Angiotensin-II, welches von Angiotensinasen abgebaut wird, beträgt wenige Minuten. Angiotensin-II bindet an zwei unterschiedliche Rezeptoren, AT1- und AT2-Rezeptor. Beide werden in der Niere präsentiert und sind charakterisiert als 7-transmembran Rezeptoren, verfügen jedoch nur über ca. 30% der homologen Proteinstruktur (50). Über Bindung von Angiotensin-II auf den AT1-Rezeptor kommt es zu einer Vasokonstriktion der Blutgefäße und zu einer gesteigerten Aldosteron Produktion und Freisetzung in der Nebennierenrinde (76, 77). Gleichzeitig kommt es zu einem negativen Feedback auf die Reninproduktion (46). Damit spielt Angiotensin-II eine zentrale Rolle in der Aufrechterhaltung des Wasser und Salzhaushaltes und der Kontrolle des Blutdrucks.

Allerdings stimuliert Angiotensin-II über den AT1-Rezeptor auch eine zelluläre Hypertrophie und Proliferation in Mesangium- (36) und Tubuluszellen (75) und induziert profibrotische und inflammatorische Prozesse in der Niere (74). Die Rolle des AT2-Rezeptors ist noch nicht ausreichend verstanden, im Gegensatz zu dem AT1-Rezeptor wird der AT2-Rezeptor weit weniger häufig in der Niere exprimiert. Kommt es jedoch zu einem Nierenschaden, zeigt sich eine deutliche Hochregulation (50). Ein negatives Feedback durch eine hohe Angiotensin-II Konzentration fehlt hier (50). Es wird vermutet, dass es durch Aktivierung des AT2-Rezeptors eher zu einer Blockierung des AT1-Rezeptors kommt (65), beziehungsweise der AT2-Rezeptor einen direkten Einfluss auf die Blutdruckabnahme durch Freisetzung von NO hat (2) und somit eine protektive Rolle in der Genese des arteriellen Hypertonus spielt (55).

1.4 Das Mineralkortikoid Aldosteron

Das Mineralkortikoid Aldosteron wird in der Zona glomerulosa der Nebennierenrinde produziert. Der Syntheseschritt bis zum Corticosteron ist identisch mit der Synthese des Cortisols in der Zona fasciculata. Durch Stimulation von Angiotensin-II oder durch Hyperkaliämie wird die Aldosteron Freisetzung gesteigert, durch Atriopeptin (ANF), einem Gegenspieler des Angiotensin-II, wird es reduziert. Aldosteron bindet im distalen Konvolut der Nierentubuli auf den zytosolischen Mineralkortikoidrezeptor und bewirkt durch die Na/K ATPase eine Natrium Resorption bei Kaliumabgabe und durch eine verstärkte Modulation epithelialer Wasserkanäle eine Wasserrückresorption im Sammelrohr (54).

Im Tiermodell erzeugt Aldosteron allerdings eine kardiale und vaskuläre Fibrose und eine vaskuläre Nekrose (33, 34). Dieser Effekt wird vermittelt durch Bindung an den Mineralkortikoidrezeptor in der Niere, dem Herz, dem Gehirn und der Gefäße (30, 33). Außerdem scheint Aldosteron eine Rolle an der Entstehung der Herzinsuffizienz zu spielen, denn es kommt zu einer gesteigerten Expression des Aldosteron-Synthase-Gens (78). In der Niere induziert Aldosteron über Mineralkortikoidrezeptoren in Mesangialenzellen, Podozyten und Fibroblasten eine Glomerulosklerose und eine tubulointestinale Fibrose. Viele der häufig verschriebenen antihypertensiv wirkenden Medikamente, wie die ACE-Hemmer oder Angiotensin-Rezeptor-Blocker, blockieren Schritte des Renin-Angiotensin-System. Trotzdem kommt es weiterhin zu einer Aldosteron Produktion. Dieses Phänomen wird Aldosteron-Escape genannt (33, 34). Bis zu 40% der Patienten, die einen ACE-Hemmer bekommen, haben eine erhöhte Plasma Aldosteron Konzentration. Anscheinend existieren weitere Wege der Signaltransduktion, unabhängig des Renin-Angiotensin-System, für die Aldosteron Produktion (34). Selbst die Kombination von ACE-Hemmer und Angiotensin-Rezeptor-Blocker senkt nicht die Plasma Aldosteron Konzentration (32).

1.5 Die Goldblatt Hypertonie

Im Jahr 1934 stellte Goldblatt die Hypothese auf, dass eine Ischämie der Niere, etwa aufgrund von Arteriosklerose der Nierenarterie, an der Pathogenese des Bluthochdrucks beteiligt ist. Schon einige Jahre zuvor waren Volhard und Fahr von der zentralen Rolle der Niere an der Pathogenese des Hypertonus überzeugt. Volhard führte dies auf einen humoralen Faktor zurück. Aber erst Hartwich, einem Schüler Volhards, gelang es 1930 durch chirurgische renale Gefäßablation an Hasen und Hunden einen transienten Hypertonus zu induzieren. Goldblatt verfeinerte die Methode und entwickelte das 1 Niere, 1 Clip und 2 Nieren, 2 Clip Modell am Hund, indem er die Nierenarterie partiell mit einem Silberclip stenosierte. Er fand ebenfalls heraus, dass, sobald nur eine Nierenarterie stenosiert ist, die kontralaterale Nierenarterie aber weiter perfundiert wird, es zu einer wesentlich geringer ausgeprägten Blutdruckerhöhung kommt (15). Schon damals vermutete Goldblatt, dass an dem mit seinem Modell erzeugten Hypertonus eine Mediatorsubstanz beteiligt sein muss.

Wilson und Byrom entwickelten diesen Gedanken im Jahr 1939 weiter und publizierten ihre Ergebnisse zu einem Versuch über die Erzeugung eines konstanten und reproduzierbaren Blutdrucks im 2 Nieren, 1 Clip Hypertoniemodell der Ratte. Sie erzeugten einen relativ konstanten Bluthochdruck und schlossen daraus, dass die Ursache der Hypertonie nach Stenosierung der Nierenarterie ein aus der ischämischen Niere gebildete und freigesetzte Substanz sein muss. Sie nannten diese Substanz Pressorsubstanz (72).

Im Jahr 1940 kam es durch Page und Braun-Menendez zur Entdeckung des Renin-Angiotensin-Systems. In den folgenden Jahren wurden die einzelnen Komponenten isoliert, charakterisiert und synthetisiert. Ebenso wurden Antagonisten und Blocker des Renin-Angiotensin-Systems entdeckt, die es ermöglichten, gezielt in das System einzugreifen (6, 39)

1.6 Angiotensin-Konversionsenzym-Hemmer (ACE)

ACE-Hemmer spielen eine wichtige pharmakologische Rolle in der Therapie des arteriellen Bluthochdrucks. Einerseits hemmen die ACE-Hemmer das Angiotensin-Konversionsenzym (ACE) und verhindern somit die Produktion von Angiotensin-II (44), dadurch kommt es zu einer Vasodilatation, wodurch der arterielle Blutdruck sinkt (16). Andererseits wird der Abbau von Kininen zu inaktiven Bruchstücken verhindert. Kinine steigern die Konzentration von NO und Prostaglandinen (27). Sie sind biologisch aktive Oligopeptide, durch Kallikrein wird aus dem biologisch inaktiven Kininogen das aktive Kinin (5). Das wichtigste Kinin ist das Bradykinin, es entfaltet seine Wirkung über Bindung auf den β_2 -Rezeptor (17) und vermittelt vasodilatatorische und antiproliferative Effekte (27). Kinine werden allerdings von verschiedenen Peptidasen (Metallopeptidasen, Serin-Peptidasen) sehr rasch wieder metabolisiert (13). Die wichtigste Peptidase ist das Angiotensin-Konversionsenzym (11).

Klinische Studien zeigten, dass es durch Einsatz der ACE-Hemmer zu einem verbesserten Überleben bei Patienten nach Myokardinfarkt mit eingeschränkter linksventrikulären Funktion kommt (43) und eine Narbenbildung des Myokards verhindert wird (28). Ein weiteres wichtiges Zielorgan der ACE-Hemmer ist die Niere. Eine über lange Zeit unbehandelte arterielle Hypertonie ist ein wesentlicher Risikofaktor für Entstehung der terminalen Niereninsuffizienz (42). Eine antihypertensive Therapie mit einem ACE-Hemmer verlangsamt die Progression chronischer Nierenerkrankungen (69, 71). Bei der diabetischen Nephropathie bewirkt eine Therapie mit einem ACE-Hemmern eine verminderte Mikroalbuminurie (45) und eine Konstanthaltung der glomerulären Filtrationsrate (GFR) im Gegensatz zu einer Therapie mit dem Beta-Blocker Metoprolol (4, 29).

1.7 Der Aldosteronantagonist Eplerenone

Eplerenone ist nach Spironolacton ein weiterer selektiver Aldosteronantagonist. Die Wirkung entfaltet Eplerenone über Bindung an den Mineralkortikoidrezeptor und verhindert somit die Aldosteron vermittelte Natrium und Wasserrückresorption in der Niere. Klinisch zugelassen ist Eplerenone für die Behandlung der arteriellen Hypertonie und der Herzinsuffizienz. Es hat sich gezeigt, dass bei medikamentösem Einsatz von Eplerenone durch Blutdrucksenkung bei Patienten mit Herzinsuffizienz, die in stabilem Zustand nach einem Herzinfarkt sind, die Sterblichkeit um 15% gesenkt werden konnte (3). Außerdem zeigte sich, dass bei inadäquat eingestelltem arteriellen Hypertonus durch einen ACE-Hemmer oder einen Angiotensin-Rezeptor-Blocker, der Einsatz von Eplerenone neben der zusätzlichen Blutdrucksenkung eine Reduzierung der Herzhypertrophie, der Gefäßinflammation, der fibrinösen Nekrose der kleinen Arterien und Arteriolen und eine Reduzierung der Kollagenzunahme in der Aorta erzielt werden konnte (48).

1.8 Das Decoypeptid

Im Jahr 2004 veröffentlichte die Gruppe um Ichihara Ergebnisse, in der ein von ihnen entwickeltes Peptid, das so genannte Decoypeptid, eine spezifische Region des (Pro)Renin- Rezeptor bindet und die Prorenin-(Pro)Renin-Rezeptorinteraktion blockiert (21). Das freiverfügbare Prorenin im Serum verfügt über eine so genannte pentametrische „handle region“ und eine tetrametrische „gate region“ und inaktiviert damit das eigene katalytischen Zentrum. Es ist bisher nicht möglich, durch Antikörper diese inaktivierende Verbindung zu lösen. Bindet das Prorenin nun auf den (Pro)Renin-Rezeptor wird die „handle region“ mit der „gate region“ durch ein Prorenin-bindendes Protein des Rezeptors nichtproteolytisch von seinem katalytischen Zentrum gelöst und das Prorenin entfaltet seine enzymatische Aktivität. Dieses wird durch das Decoypeptid verhindert (59). Im Tiermodell zeigte sich, durch Einsatz des Decoypeptides, eine Verminderung der kardiovaskulären und renalen Schäden bei Hypertonie und Diabetes mellitus. Besonders bei der diabetischen Nephropathie konnte eine Abnahme von Proteinurie, Glomerulosklerose und Glomerulonephritis gezeigt werden (19, 20, 21). Ratten, die den (Pro)Renin-Rezeptor überexprimierten entwickelten eine Proteinurie und Glomerulosklerose mit zunehmendem Alter (23).

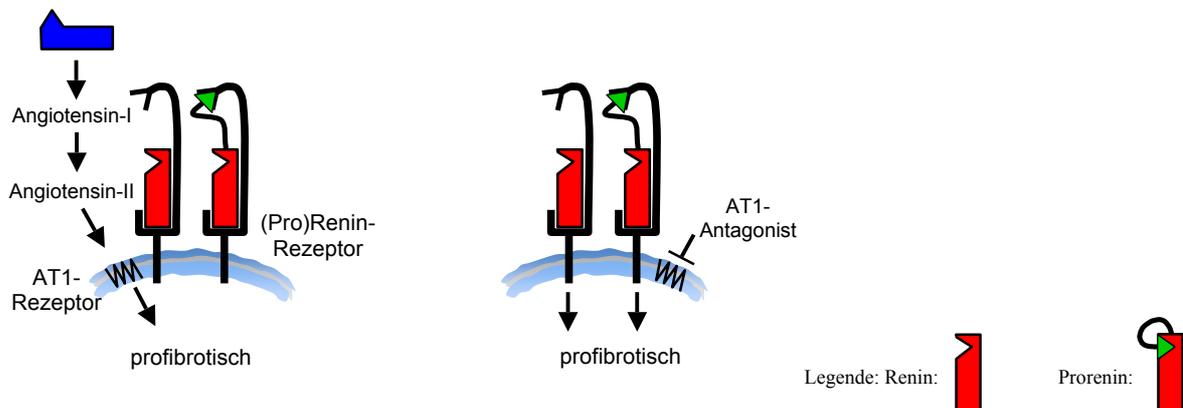


Abb.1: Schematische Abbildung der profibrotischen Signaltransduktion durch Angiotensin-II, Prorenin und Renin in der stenosierten Niere. Bindung von Renin an den Rezeptor verstärkt seine katalytische Aktivität. Bindung von Prorenin führt dazu, dass Prorenin ebenfalls katalytisch aktiv wird und mehr Angiotensin-I und Angiotensin II gebildet werden und über den AT-1 Rezeptor profibrotisch wirken. Interessanterweise führt die Bindung von Renin und Prorenin, unter Umgehung des AT-1 Rezeptors, auch zu einem direkten profibrotischen Signaling.

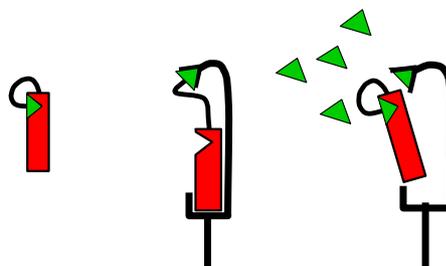


Abb.2: Theoretische Interaktion des Decoypeptides mit dem (Pro)Renin-Rezeptor. Durch Applikation des Decoypeptides kommt es nicht zur Freisetzung des katalytischen Zentrums von Prorenin am (Pro)Renin-Rezeptor. Die profibrotische Wirkung und Aktivierung von Prorenin bleibt aus.

1.9 Ziel der Doktorarbeit

Unter ACE-Hemmer Therapie kommt es in der stenosierten Niere zu einer Nierenschädigung mit Fibrose und Entzündung (25). Ziel der vorliegenden Arbeit ist es zu untersuchen, ob eine Blockade der (Pro)Renin – (Pro)Renin-Rezeptor – Interaktion oder eine Aldosteronblockade die ACE-Hemmer induzierte Schädigung vermindert.

2. Methoden

2.1 Tierhaltung und Ernährung

Für diese Studie wurden 124 männliche Sprague-Dawley-Ratten (Charles River, Kisslegg, Deutschland) verwendet. Die Tiere wurden in der Zentralen Tierhaltung des Universitätskrankenhauses Hamburg Eppendorf gehalten, eine Tierpflegerin übernahm die Betreuung der Tiere und die pflegerischen Aufgaben. Pro Käfig wurden 2-3 Tiere gehalten. Die Stallungen unterlagen einem Lichtregime, mit je 12 Stunden künstlichem Licht (400 Lux), von 6 Uhr morgens bis 18 Uhr abends. Die Raumtemperatur betrug 20 °C (+/- 1°C) und Luftfeuchtigkeit von 50 % (+/-5%). Die Tiere hatten jederzeit einen freien Zugang zum Wasser. Die zwei Gruppen, die keine medikamentöse Behandlung erhielten, bekamen ein Standardfutter (Firma ssniff, Soest, Deutschland). Der ACE-Hemmer Enalapril wurde in der Dosierung 200mg/l dem Trinkwasser zugeführt. Eplerenone wurde in der Dosierung 2mg/g dem Tierfutter zugesetzt. Das Decoypeptid (NH₂-RILLKKMPSV-COOH, Biosyntan, Berlin, s.c. 0.1 mg/kg) wurde über subcutan eingebrachte osmotische Minipumpen kontinuierlich appliziert. Alle zwei Wochen wurden die Pumpen ausgetauscht. Die Tiererkennung erfolgte über eine Markierung am Schwanz. Ein Tierversuchsantrag wurde vor der Durchführung der Versuche von der zuständigen Behörde in Hamburg genehmigt. Die Experimente wurden anhand der Richtlinien für experimentelle Tierversuche der American Physiological Society durchgeführt.

2.2 Die Clip-Operation

Die Operation erfolgte anhand eines rechtsseitigen Flankenschnittes unter Freipräparation der rechten Nierenarterie und Platzierung des Clips, die kontralaterale Niere blieb unberührt. Die Muskulatur wurde vernäht und die Haut mit Wundklammern verschlossen. In der Gruppe der scheinoperierten Kontrolltiere wurde die Operation genauso durchgeführt, jedoch ohne Aufsetzen der Klammer auf die Nierenarterie.

2.3 Das Blutdruckmessen

Der systolische Blutdruck wurde nach dem Riva-Rocci-Prinzip mittels Schwanzplethysmographie an der wachen Ratte gemessen. Dabei wurde die Körpertemperatur der Ratte in vorgewärmten separaten Röhrchen um 0,3-0,5°C erhöht. Mittels Thermometer konnte die exakte Wassertemperatur zur Blutdruckmessung (39° Wassertemperatur) abgelesen werden. Die Rattenschwanzarterie, welche den Wärmehaushalt der Ratte reguliert, dilatiert durch die Erwärmung und erzeugt Pulsationen, die mit einem Piezoelement (Heinz-Albrecht) aufgenommen, elektronisch verstärkt und optisch sichtbar gemacht wurde (TSE-Systems, Bad Homburg, Deutschland)). Mit einer Druckmanschette (Innendurchmesser 9 mm, Breite 3 cm) wurde die Schwanzarterie an der Schwanzwurzel über ein Gauer-Druckmanometer über den systolischen Druck hinaus okkludiert. Der Manschettendruck wurde mit einer definierten Geschwindigkeit von 3-5 mmHg/s abgelassen und der systolische Druck bei den ersten regelmäßigen optischen pulssynchronen Pulsationen notiert. In das Protokoll kamen nur Ratten die einen systolischen Blutdruck über 160 mmHg 4 bez. 6 Wochen nach Clip Operation hatten. 92 von 216 geclippten Ratten entwickelten keine Hypertonie (42,6 %). Diese Ratten wurden eingeschläfert.

2.4 Die Tiergruppen

Es wurden in zwei unterschiedlichen Studienprotokollen folgende Tiergruppen untersucht

Vierwöchige Therapie: Enalapril vs. Enalapril + Decoypeptid

- | | | |
|---------------------------|--|-------|
| • Kontrollen | Normotensive Kontrolltiere | (n=5) |
| • Goldblatt | 2 Nieren – 1 Clip hypertensive Tiere | (n=4) |
| • Enalapril | 2 Nieren – 1 Clip hypertensive Tiere
+ Enalapril (200 mg/l Trinkwasser) | (n=7) |
| • Decoypeptid + Enalapril | 2 Nieren – 1 Clip hypertensive Tiere
+ Enalapril (200 mg/l Trinkwasser)
+ Decoypeptid (osmotische Minipumpen s.c.) | (n=8) |

Sechswöchige Therapie: Enalapril vs. Eplerenone

- | | | |
|---------------------------------------|---|--------|
| • Kontrollen | Normotensive Kontrolltiere | (n=26) |
| • Goldblatt | 2 Nieren – 1 Clip hypertensive Tiere | (n=19) |
| • Enalapril | 2 Nieren – 1 Clip hypertensive Tiere
+ Enalapril (200 mg/l Trinkwasser) | (n=10) |
| • Enalapril + Hydrochlorthiazid (HCT) | 2 Nieren – 1 Clip hypertensive Tiere
+ Enalapril (200 mg/l) + HCT
(50 mg/2 ml Methanol/l Trinkwasser) | (n=8) |
| • Enalapril + Eplerenone | 2 Nieren – 1 Clip hypertensive Tiere
+ Enalapril (200 mg/l) + Eplerenone
(2mg/g Futter) | (n=11) |
| • Eplerenone | 2 Nieren – 1 Clip hypertensive Tiere
+ Eplerenone (2 mg/g Futter) | (n=12) |

2.5 Die Urinanalyse

Zur Urinanalyse wurden die Tiere sowohl vor Therapie als auch am Ende des Versuches, in Stoffwechselkäfigen 24 Stunden gehalten. In dieser Zeit wurde der Urin, zwecks Kreatininbestimmung, gesammelt. Die Tiere hatten freien Zugang zum Wasser, nicht aber zum Futter.

2.6 Die renale Funktion

Um die Gesamtnierenfunktion zu untersuchen, wurde die Kreatinin Clearance aus dem 24-Stunden-Urin und dem Plasmakreatinin bestimmt. Plasma- und Urinkreatinin wurden mit einem Autoanalyzer (Hitachi 717; Roche, Mannheim, Deutschland) gemessen. Die Albuminurie wurde mit einem kommerziellen ELISA gemäß den Vorschriften des Herstellers gemessen.

2.7 Die Organentnahme

Die Organe wurden nach dem jeweiligen Studienprotokoll zu unterschiedlichen Zeiten entnommen. Die Blutdrucksenkungstherapie unter Eplerenone dauerte 6 Wochen, das De-coypeptid wurde über 4 Wochen appliziert. Die Organentnahme erfolgte aber nach folgendem festgelegten Schema: Nach Eröffnung der Bauchhöhle in Narkose wurde die Aorta frei präpariert und mittels Venenpunktionsnadel Blut entnommen. Danach wurde die Aorta oberhalb der Abgänge der Nierenarterie per Clip abgeklemmt und die stenosierte Niere mit eiskalter Phosphat-gepufferter Kochsalzlösung perfundiert, bis die Nieren vollständig verblasst waren. Danach erst wurden die Nieren entnommen, gewogen und als Schnitte in 4 % gepufferten Formalin für die Histologie vorbereitet.

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

Total-RNA wurde vom Nierencortex der geclippten Niere isoliert mit Phenol-Chloroform-Extraktion nach direkter Lyse der Glomeruli in 4 M-Guanidinium-Thiocyanate, 25 mM Natrium-Citrat, pH 7, 0,5% Sacrosyl, 0.1 M2-Mercaptoethanol, wie im Labor etabliert (40). Real-time PCR wurde mit AbiPrism NN8650, unter Einsatz von SYBR green als Farbstoff, durchgeführt (40). Die Quantifizierung erfolgte mit GAPDH als eine interne Kontrolle für die Korrektur kleiner Variationen in RNA-Menge und cDNA-Synthese, wie in AbiPrism beschrieben.

Die präsentierten Ergebnisse sind Mittelwerte 6 unabhängig durchgeführter RT-PCRs, die mit verschiedenen RNAs, je gepoolt von 2-4 Ratten, erfolgt sind. Die im Folgenden dargestellten rattenspezifische PCR-Primer wurden in dieser Studie eingesetzt.

Primer	forward	reverse
Mig	Fw 5'AAT CCC TCA AAG ACC TCA AAC AGT 3'	Rev 5'GCA GGT TTG ATC TCC GTT CTT C 3'
CXCR3	Fw 5'TCG GCT CTG GTC TCT GCA A 3'	Rev 5'GCT TAT ACA GGC CAG CAG GAA 3'
Renin	Fw 5'GCT ACA TGG AGA ATG GGA CTG AA 3'	Rev 5'ACC ACA TCT TGG CTG AGG AAA C 3'
Reninrezeptor	Fw 5'TTC TGA ACT GCA AGT GCT GCA T 3'	Rev 5'CTG CCA GCT CCA GTG AAT ACA AG 3'
PAI-1	Fw 5'CAA GTC TGA TGG TAG CAC CAT CTC 3'	Rev 5'CCG GAG TGG TGA ACT CAG TGT 3'

2.9 Die renale Morphologie

Für die Histochemie wurden 4% Formalin-fixierte Nierenscheiben Paraffin-gebettet, als 1-3µm dicke Schnitte abgetragen und PAS-gefärbt (PAS, Sigma, Ulrichtein, Deutschland). Das tubulointestinale Volumen wurde durch Überlagerung eines Gitters, welches mit 40 Punkten quantifiziert war, auf lichtmikroskopische Bilder aufgelegt und quantifiziert. Die Anzahl der über Tubuluszellen, Glomerulie oder Interstitium liegenden Punkte wurden gezählt und durch einen Prozentsatz aller Probepunkte berechnet. Pro Niere wurden zwei Felder, Cortex nah und einmal distaler zum Mark, gewählt und die Punkte ausgezählt (24). Die glomeruläre Größe wurde planimetrisch mit einem semiautomatischen Bildverarbeitungssystem (Morphomat 30, Zeiss, Oberkochen) vermessen. Hierbei wurden pro Nierenschnitt 20 Glomeruli in einer meanderförmigen Bewegung von Rinde zu Mark und zurück vermessen und die mittlere glomeruläre Querschnittsfläche (AG) vermessen. Das durchschnittliche glomeruläre Volumen (VG) wurde dann als $=(\beta/k)(AG)^{3/2}$ berechnet, wobei $\beta=1,38$ und $k=1,1$ jeweils Form- und Größenverteilungskoeffizienten darstellen (38). Die Thoraxaorta wurde mittels PAS gefärbt. Die mittlere Dicke der Media wurde in 20 zufälligen Messungen pro Thoraxaorta durch Morphometrie bestimmt. Ausgewählt wurden nur Gefäßabschnitte, die den gesamten Durchmesser der Gefäße enthielten. Anschließend wurde die mittlere mediale Dicke bestimmt.

2.10 Die Immunhistochemie

Für die Immunhistochemie wurden 1-3 µm Paraffinschnitte deparaffinisiert und rehydriert. Die Färbung fand nach Antigen-Aufbereitung mit Protease-24 (15 min, 5mg/1 ml; Sigma Ulrichstein, Deutschland) oder mittels Mikrowellen-Behandlung mit Tris-basierter Kochsalzlösung Tween-EDTA, pH 9.0 oder Citrat-Puffer, pH 6.1, für 25 Minuten statt. Nach dem Blocken der unspezifischen Bindungsstellen mit 5% Pferde- oder Ziegen Serum, (VECTOR, Ebersberg, Deutschland) für 30 Minuten bei Raumtemperatur, wurden Schnitte mit einem Antikörper gegen T-Zell Marker CD3 (1:400, über Nacht bei 4 °C, Ab-1; Calbiochem, San Diego, CA, USA) gefärbt. Sekundäre Antikörper (biotinylated affinity-purified Esel IgG) wurden 30 Minuten, bei Raumtemperatur, bei einer 1:400 Verdünnung (alle sekundären Antikörper Jackson Immunoresearch-Laboratories, West Grove, PA, USA) inkubiert. Die Signalverstärkung wurde mittels dem ABC-APKit von VECTOR (s.o.), entsprechend der Anleitung des Herstellers, durchgeführt. Die Nuklei wurden mit Mayer's Hemalaun 1 Minute lang gegengefärbt und mit HCl-Ethanol differenziert.

2.11 Bestimmung von Prorenin und Renin

Die Bestimmung von Renin im Prorenin erfolgte in der Pharmakologie der Universität Rotterdam im Labor von Jan Danser wie beschrieben (9)

2.12 Statistische Analyse

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

3. Ergebnisse

Versuchsprotokoll Decoypeptid

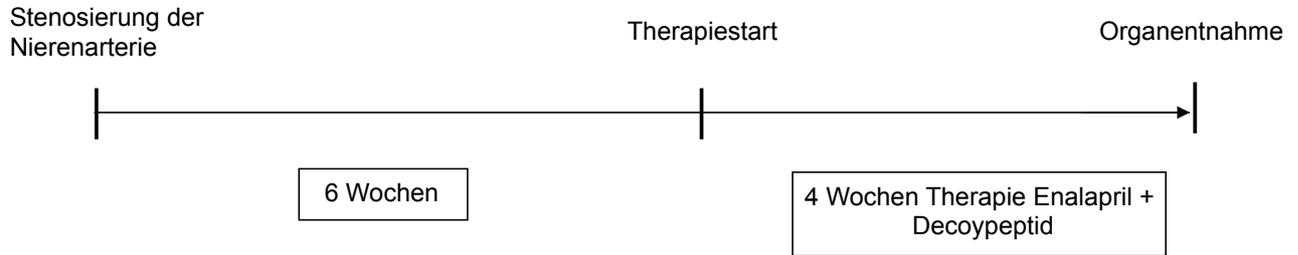


Abb.3: Zeitachse des Therapieaufbau: Nach erfolgter operativer Stenosierung der Nierenarterie wurde über 6 Wochen der Blutdruck gemessen. Hiernach Selektion und Einteilung in die jeweiligen Therapiegruppen und Beginn der vierwöchigen Therapie mit Enalapril und Decoypeptid. Abschließend erfolgte die Organentnahme.

3.1 Generelle Charakteristika

Während der vierwöchigen Therapie überlebten in allen Gruppen 100% der Tiere. Vor Therapiestart und nach vier Wochen wurde das Körpergewicht bestimmt. Im Zuge der antihypertensiven Therapie mit Enalapril lässt sich eine Tendenz mit Abnahme des Körpergewichts ablesen, die aber nicht signifikant war. In der Gruppe der unbehandelten hypertensiven Ratten (Goldblatt Gruppe) kam es zu keiner Abnahme des Körpergewichtes.

Tab.1: Tieranzahl, Überlebensrate, Körpergewicht vor und nach Therapie

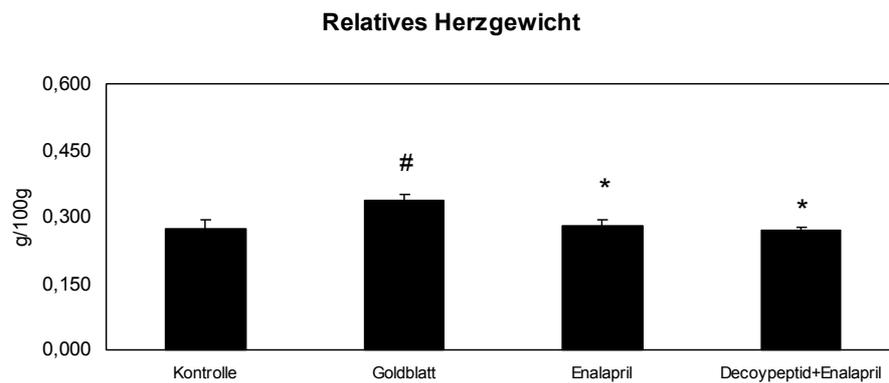
	n	Überlebensrate (%)	Körpergewicht vor Therapie (g)	Körpergewicht nach Therapie (g)
Kontrollen	5	100%	420 ± 8	510 ± 20
Goldblatt	4	100%	418 ± 9	508 ± 17
Enalapril	7	100%	420 ± 8	495 ± 15
Decoypeptid + Enalapril	8	100%	419 ± 10	469 ± 14

3.2 Relatives Herz- und Nierengewicht

Nach Organentnahme wurden das Herzgewicht und das Nierengewicht der geclippten Niere bestimmt. In der Gruppe der unbehandelten hypertensiven Tiere (Goldblatt) entwickelte sich eine Hypertrophie des Herzens. Enalapril und Decoypeptid + Enalapril behandelte Tiere hatten ein signifikant kleineres Herzgewicht.

Gleichzeitig zeigten die unbehandelt hypertensiven Tiere (Goldblatt) eine nichtsignifikante Gewichtsreduktion, während Enalapril zu einer signifikanten Abnahme des Gewichts führte. Unter Enalapril + Decoypeptid war dieser Effekt nicht zu beobachten.

A



B

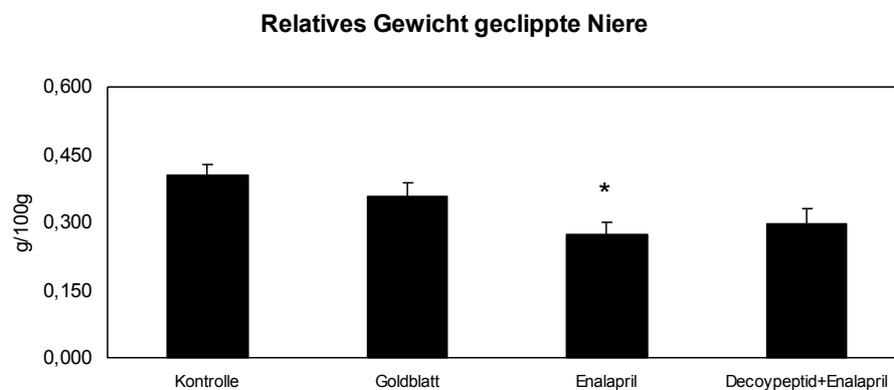


Abb.4: Bestimmung des Herz- und Nierengewichts nach Organentnahme. Signifikante Hypertrophie des Herzens bei den unbehandelt hypertensiven (Goldblatt) Tieren. Unter Enalapril kommt es zu keiner kardialen Veränderung (A). Atrophie der geclippten Niere unter Enalapril (B).
 $p < 0.05$ vs. Kontrollen, $*p < 0.01$ vs. Goldblatt

3.3 Die Blutdruckmessung unter Therapie

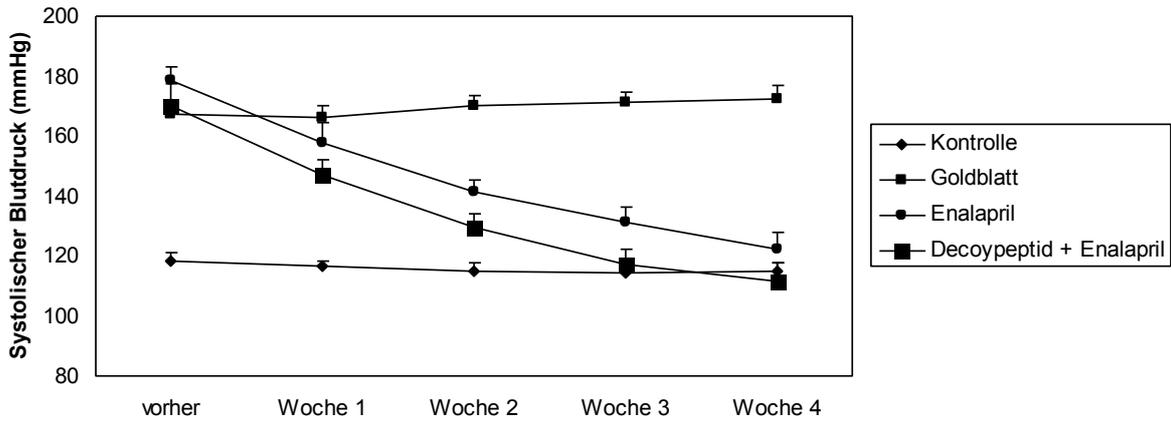


Abb.5: Systolischer Blutdruck unter vierwöchiger Therapie.

Während der vierwöchigen Therapie wurde der systolische Blutdruck wöchentlich gemessen. In der Gruppe der unbehandelten hypertensiven Tiere (Goldblatt) konnte ein signifikant erhöhter Blutdruck gemessen werden. Unter Enalapril und Decoypeptid + Enalapril kam es zu einer Blutdrucksenkung auf normotensive Werte, wobei der Blutdruck in der Kombinationstherapie Decoypeptid + Enalapril gegenüber den unbehandelten hypertensiven Ratten (Goldblatt-Gruppe) etwas stärker gesenkt wurde als durch Enalapril Monotherapie. Der mittlere systolische Blutdruck der 5 Messungen während der Behandlung ist in Tabelle 2 dargestellt.

Tab.2: Systolischer Blutdruck

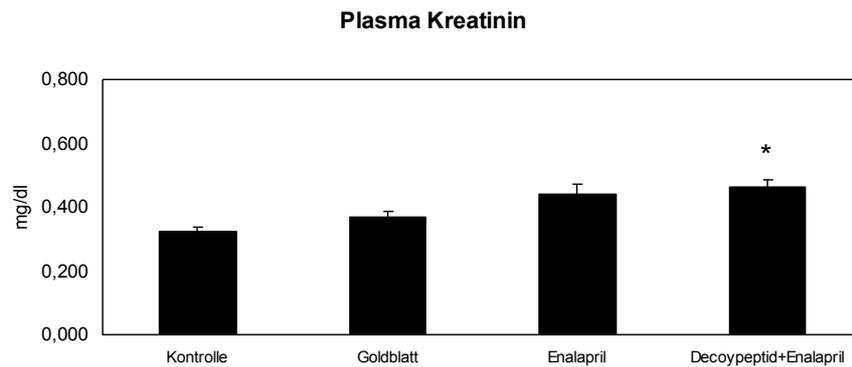
Gruppe	Kontrolle	Goldblatt	Enalapril	Decoypeptid + Enalapril
Systolischer Blutdruck (mmHg)	115 ± 1	169 ± 1#	146 ± 10*	135 ± 10**

*=p<0.05, vs. Goldblatt, **=p0.0125 vs. Goldblatt, #=p<0.001 vs. Kontrollen

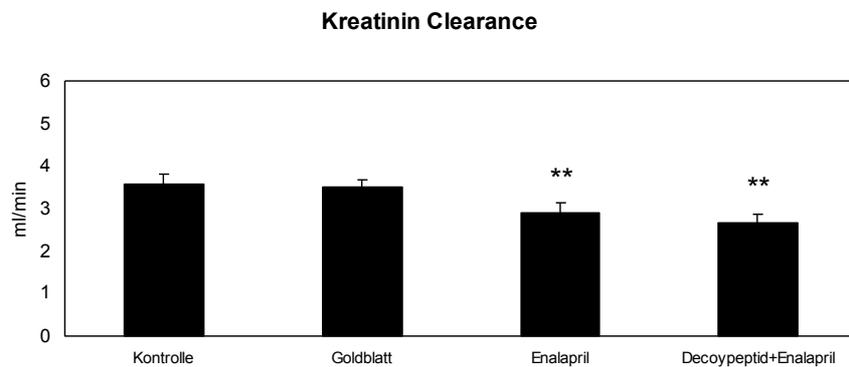
3.4 Die Nierenfunktion

Am Ende des Versuchs führten wir einen Stoffwechselkäfig durch und sammelten 24 Stunden den Urin für die Kreatinin Clearance. Bei Organentnahme wurde per Punktion der Aorta Blut entnommen und die Plasma-Kreatininkonzentration und der Harnstoff-N gemessen. Unter Enalapril verschlechterte sich die Nierenleistung mit Anstieg der Plasma-Kreatininkonzentration und Abnahme der Kreatinin Clearance, sowie einem mit Anstieg des Harnstoffs im Blutserum. Das Decoypeptid zeigte hier keinerlei Effekt auf die Nierenfunktion.

A



B



C

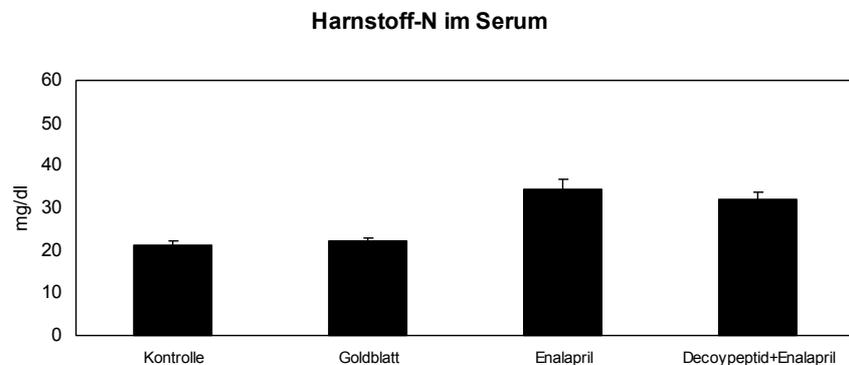


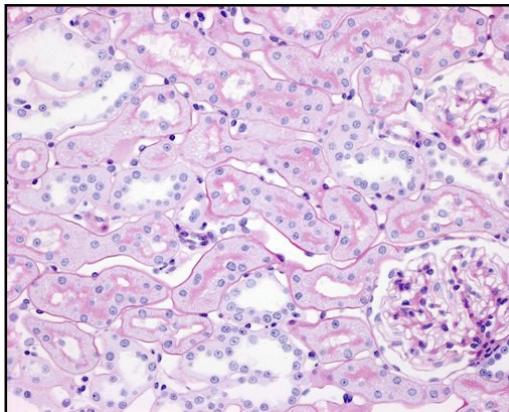
Abb.6: Laborchemische Nierenparameter: Enalapril-Therapie führt zu einer erhöhten Kreatinin Clearance und einem erhöhten Plasma Kreatinin. Das Decoypeptid hat keinen Effekt auf die Nierenfunktion (A und B). Harnstoff ist im Serum unter Enalapril-Therapie zwar erhöht, zeigt aber keine Signifikanz (C).

*= $p < 0.01$ vs. Goldblatt, **= $p < 0.001$ vs. Goldblatt

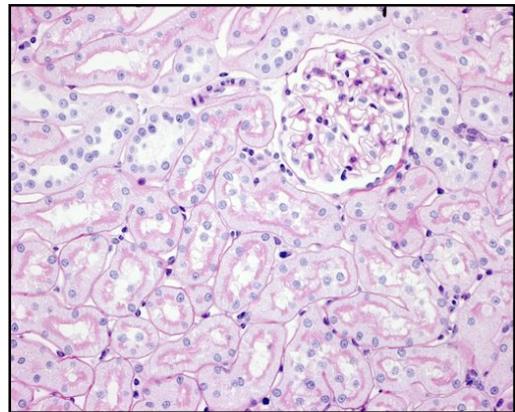
3.5 Renale morphologische Veränderungen in PAS Nierenschnitten

Es wurden PAS-gefärbte Nierenschnitte der geclippten Nieren angefertigt. In der Abb. 7 A-D sind die Histologien nach Therapie dargestellt. Es zeigten sich bei den normotensiven Kontrollen keine tubulointestinalen Auffälligkeiten. In den Präparaten der unbehandelten hypertensiven Ratten (Goldblatt-Gruppe) stellte sich eine mäßige Zunahme des interstitiellen Volumens mit gelegentlichen fokalen tubulären Schäden dar. Bei den mit Enalapril antihypertensiv behandelten Tieren ließ sich eine massive interstitielle Verbreiterungen und schwerer tubulärer Atrophie und Dilatation abbilden. Das Decoypeptid hatte keinen Effekt auf die durch Enalapril verursachte Schädigung.

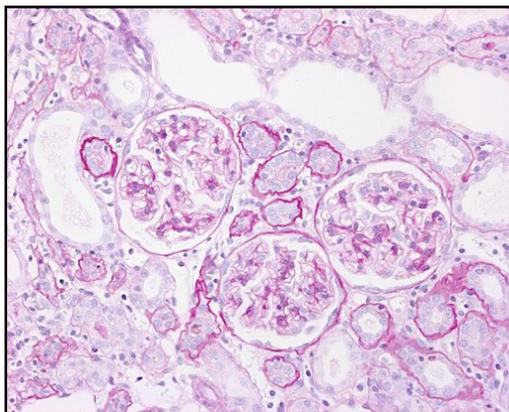
A: Kontrolle



B: Goldblatt



C: Enalapril



D: Decoypeptid + Enalapril

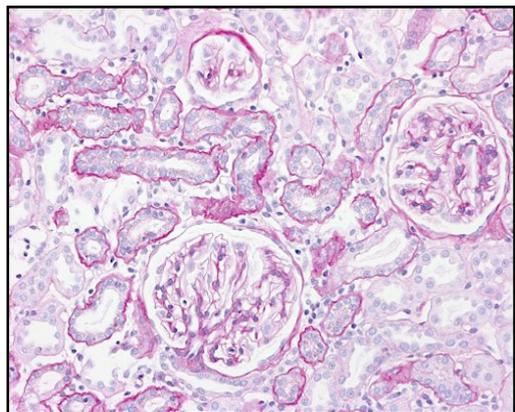


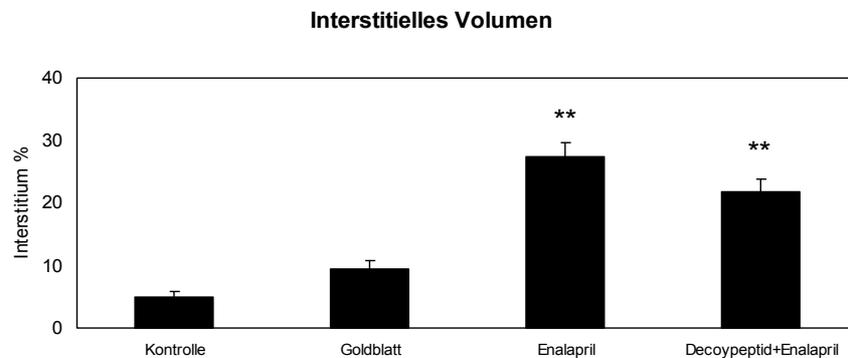
Abb.7: A-D: Lichtmikroskopische Bilder der histopathologischen Veränderungen der geclippten Niere. Die Tubuli sind in den Kontrollen gut erhalten (A). Mäßige Zunahme der tubulointerstitiellen Schäden in der geclippten Niere der Goldblatt Gruppe (B). Massive tubulointerstitielle Schäden in den mit Enalapril behandelten Gruppen (C und D). Durch Zugabe des Decoypeptides ergibt sich histopathologisch kein Unterschied in Ausmaß und Qualität der Schäden im Vergleich zu Enalapril in Monotherapie (D).

3.6 Fibrotische und interstitielle Veränderungen der Niere

Zur Quantifizierung der Schäden in der geclippten Niere wählten wir zwei unterschiedliche Verfahren aus. Zum einen zählten wir per Raster Punkte auf PAS gefärbten Nierenhistologien aus und ermittelten so das interstitielle Volumen der geclippten Niere. Sowohl in der Gruppe unter Enalapril-Monotherapie, als auch in der Kombinationsgruppe Decoypeptid + Enalapril, zeigte sich eine signifikante prozentuale Zunahme des interstitiellen Volumens. Zur weiteren Objektivierung der tubulointerstitiellen Schäden der geclippten Niere bestimmten wir die Expression des profibrotischen Faktors Plasminogen-Aktivator-Inhibitors-1 (PAI-1). Die Expression von PAI-1 korreliert sehr gut mit der Fibrose.

Unter zunehmender blutdrucksenkender Therapie mit Enalapril kam es zu einer numerischen Zunahme der PAI-1 Expression in der geclippten Niere. Aufgrund der hohen Variabilität war der Effekt allerdings nicht signifikant. Die Kombination Decoypeptid + Enalapril erhöhte signifikant die PAI-1 Expression.

A



B

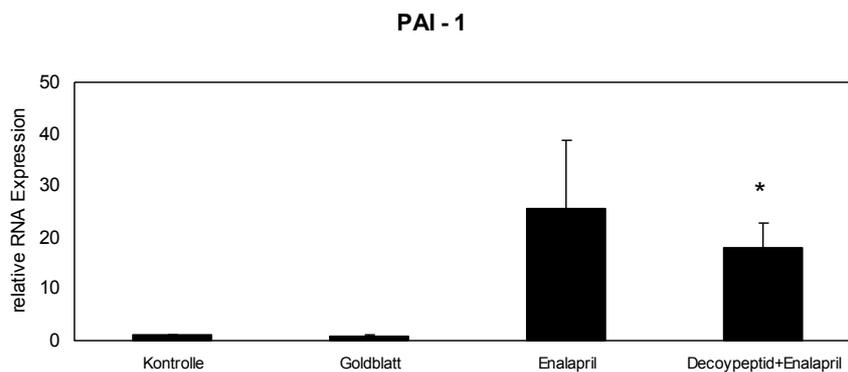


Abb.8: Quantifizierung der renalen Schäden. Zunahme des interstitiellen Volumens (A) und erhöhte relative RNA Expression von PAI-1 (B) in der geclippten Niere unter Therapie mit Enalapril. Das Decoypeptid führt zu keiner nephroprotektiven Wirkung in der Niere.

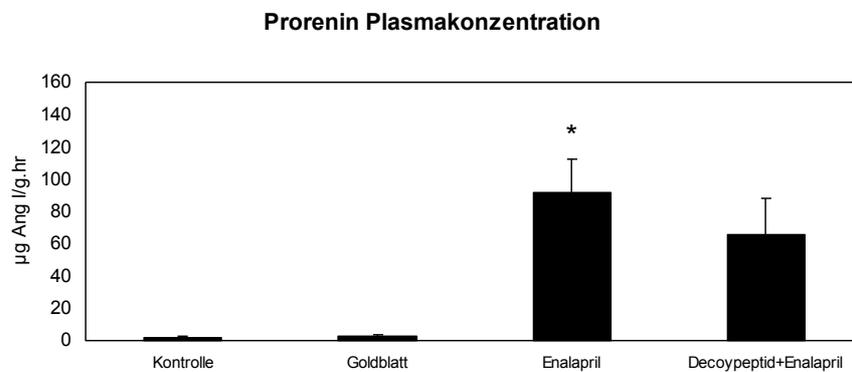
*= $p < 0.01$ vs. Goldblatt, **= $p < 0.001$ vs. Goldblatt

3.7 Veränderungen der Prorenin und Renin Plasmakonzentration

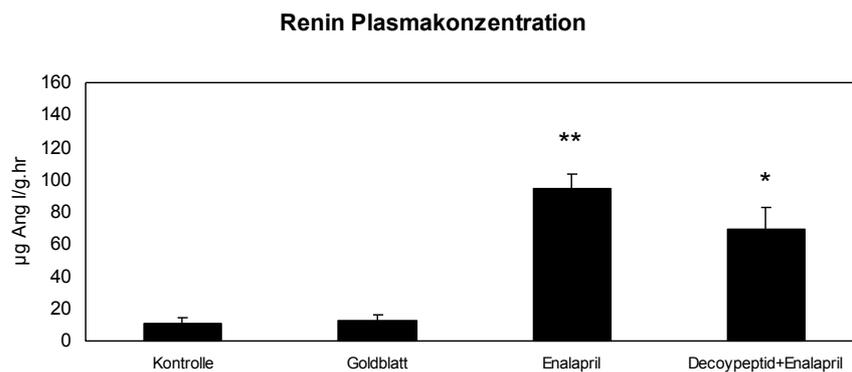
Bei Organentnahme punktierten wir intraoperativ die Aorta und gewannen Blutproben zur Bestimmung der Plasma Prorenin und Renin Konzentration. In der Gruppe der unbehandelten hypertensiven Tiere kam es weder zu einer erhöhten Plasmakonzentration von Prorenin noch von Renin. Durch Einsatz von Enalapril konnten wir hingegen eine massiv erhöhte Konzentration sowohl von Prorenin, als auch von Renin messen. Dabei war die Erhöhung unter Enalapril stärker ausgeprägt als unter der Decoypeptid + Enalapril Kombinationstherapie.

Des Weiteren bestimmten wir die Prorenin und Renin Konzentration in der geclippten Niere. Während die Prorenin Konzentration unterhalb des messbaren Bereiches lag, zeigte sich eine Zunahme der Reninkonzentration unter Enalapril und in der Kombination Enalapril + Decoypeptid, allerdings ohne statistische Signifikanz gegenüber den unbehandelten hypertensiven Tieren.

A



B



C

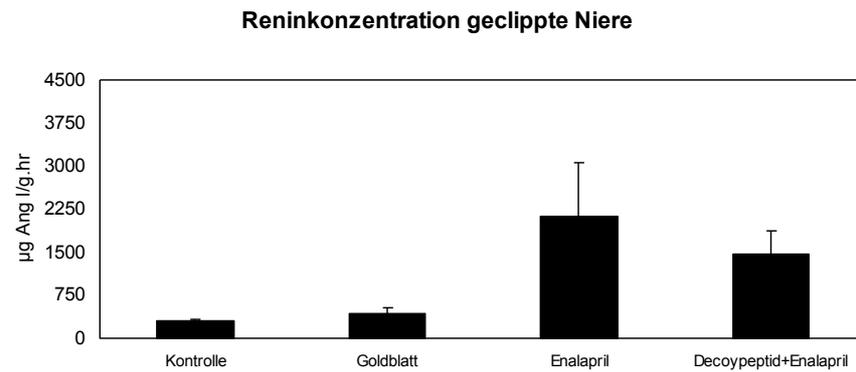


Abb.9: Prorenin und Renin Plasmakonzentration (A und B). Bei den unbehandelten antihypertensiven Tieren (Goldblatt Gruppe) zeigt sich keine erhöhte Prorenin und/oder Renin Konzentration. Durch antihypertensive Therapie kommt es zu einer signifikant gesteigerten Konzentration von Prorenin und Renin. Die Werte sind für Enalapril Monotherapie höher, als unter der Kombinationstherapie Decoypeptid + Enalapril. Abbildung C zeigt die Reninkonzentration der geclippten Niere: Zunahme der Reninkonzentration in den antihypertensiv behandelten Tieren ohne statistische Signifikanz.

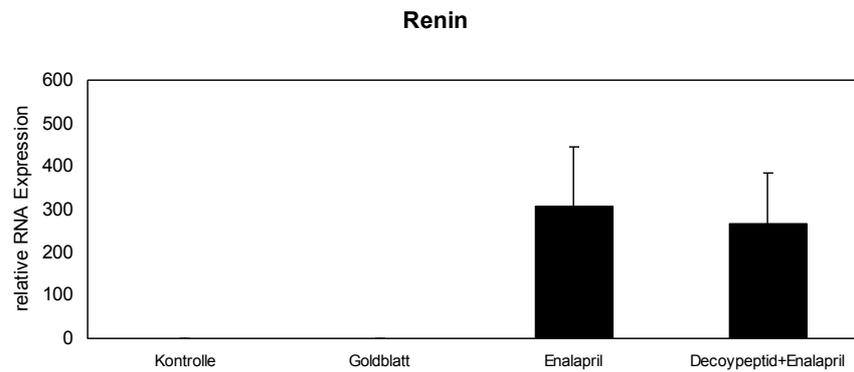
*= $p < 0.05$ vs. Goldblatt, **= $p < 0.001$ vs. Goldblatt

3.8 Bestimmung der Renin und Reninrezeptor Expression

Im Folgenden bestimmten wir durch PCR-Analyse der mRNA im Gesamtcortex die Renin und Reninrezeptorexpression der geclippten Niere. Durch die blutdrucksenkende Wirkung von Enalapril mit Blockade der Angiotensin-II Produktion entwickelt sich eine etwa dreihundertfach gesteigerte mRNA Expression von Renin in der geclippten Niere, im Vergleich zu den unbehandelten hypertensiven Ratten (Goldblatt).

Gleichzeitig haben wir die Expression des Reninrezeptors der geclippten Niere gemessen. Auch hier kommt es unter antihypertensiver Therapie mit Enalapril zu einer gesteigerten mRNA Expression. Der Effekt ist allerdings statistisch nicht signifikant.

A



B

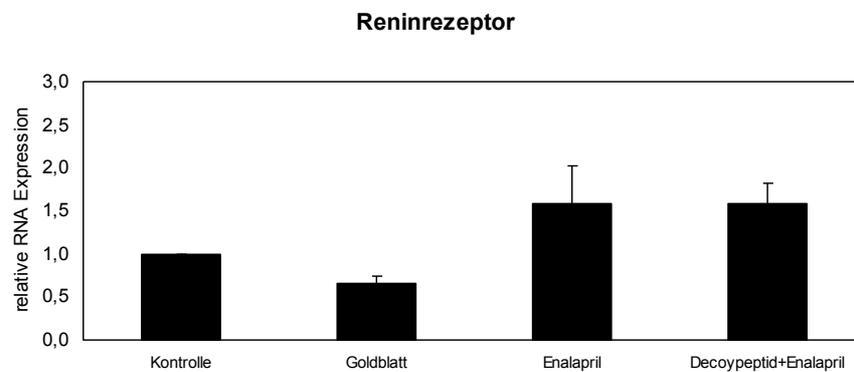


Abb.10: PCR Analyse der mRNA Renin und Reninrezeptor Expression des Gesamtnierencortex der geclippten Niere (A und B). Durch antihypertensiver Therapie kommt es zu einer gesteigerten Expression von Renin und des Reninrezeptors im Vergleich zu den unbehandelten hypertensiven Ratten (Goldblatt Gruppe).

Versuchsprotokoll Eplerenone

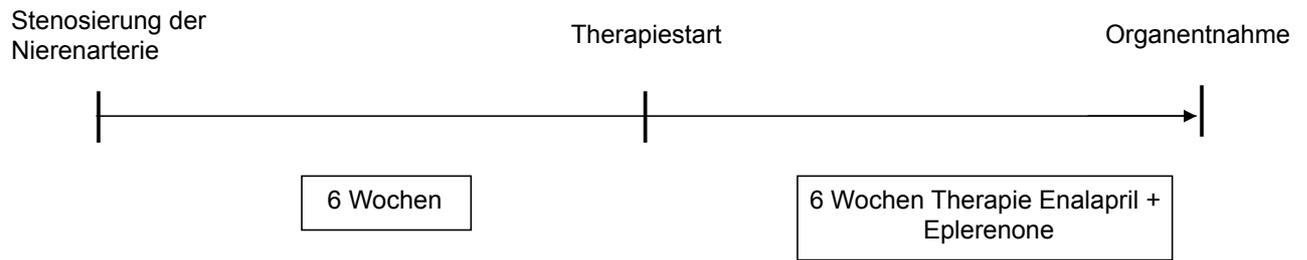


Abb.11: Zeitachse des Therapieaufbau: Nach erfolgter operativer Stenosierung der Nierenarterie wurde über 6 Wochen der Blutdruck gemessen. Danach Selektion und Einteilung in die jeweiligen Therapiegruppen und Beginn der sechswöchigen Therapie mit Enalapril und Eplerenone. Abschließend erfolgte die Organentnahme.

3.9 Generelle Charakteristika Enalapril vs. Eplerenone

Nach der sechswöchigen Therapie überlebten in der Gruppe der hypertensiven Ratten ohne Therapie (Goldblatt) 19 von 23 Tieren (82,6%), in der Gruppe Eplerenone Monotherapie 12 von 14 Tieren (85,7%) und in der Gruppe Eplerenone + Enalapril 11 von 12 Tieren (91,6%). In allen anderen Gruppen überlebten 100% der Tiere.

Vor und zum Ende des Versuchsprotokolls bestimmten wir das Körpergewicht der Tiere. Unter antihypertensiver Therapie kommt es zu einer dezenten Körpergewichtsabnahme.

Tab.3: Tieranzahl, Überlebensrate, Körpergewicht vor und nach der Therapie.

	n	Überlebensrate %	Körpergewicht vor Therapie (g)	Körpergewicht nach Therapie (g)
Kontrollen	26	100%	424 ± 10	515 ± 14
Goldblatt	19	82,60%	431 ± 12	491 ± 15
Enalapril	10	100%	437 ± 9	469 ± 14
Enalapril + HCT	8	100%	430 ± 9	464 ± 23
Eplerenone	12	85,70%	432 ± 12	464 ± 22
Enalapril + Eplerenone	11	91,60%	429 ± 10	467 ± 12

3.10 Die Blutdruckmessung unter sechswöchiger Therapie

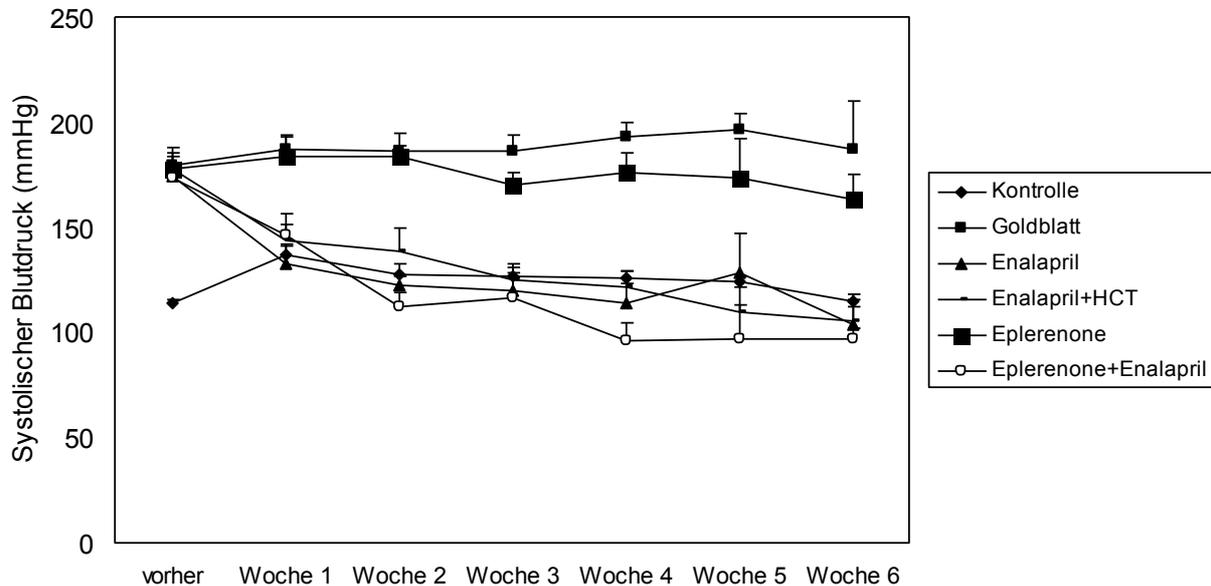


Abb.12: Systolischer Blutdruck unter sechswöchiger Therapie.

Der systolische Blutdruck wurde - wie in Abbildung 12 dargestellt - während der Behandlungszeit von 6 Wochen gemessen. Zur Blutdrucksenkung wurden Enalapril, Enalapril + HCT, Enalapril + Eplerenone und Eplerenone eingesetzt. Eplerenone Monotherapie hatte keinen signifikanten Effekt auf den Blutdruck gegenüber den unbehandelten hypertensiven Ratten (Goldblatt-Gruppe). Die antihypertensive Therapie mittels Enalapril, Enalapril + HCT und Enalapril + Eplerenone senkte den Blutdruck, gegenüber den unbehandelten hypertensiven Ratten (Goldblatt-Gruppe) signifikant, während die Blutdruckwerte der Goldblatt-Gruppe gegenüber der Kontrolle signifikant höher waren. Der mittlere systolische Blutdruck der 7 Messungen während der Behandlung von 6 Wochen ist in Tabelle 4 dargestellt.

Tab.4: Systolischer Blutdruck

Gruppe	Kontrolle	Goldblatt	Enalapril	Enalapril + HCT	Eplerenone	Enalapril + Eplerenone
Systolischer Blutdruck (mmHg)	124 ± 3	188 ± 2 #	128 ± 8 *	132 ± 9 *	175 ± 3	120 ± 11*

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

3.11 Die Nierenfunktion und Aldosteronkonzentration

Um einen Überblick über die Gesamtnierenfunktion nach Therapieende zu gewinnen bestimmten wir per 24 - Stunden - Sammelurin die Kreatinin Clearance. Es zeigte sich weder bei den hypertensiven unbehandelten Tieren (Goldblatt), noch bei den mit Enalapril behandelten Tieren eine signifikante Zunahme des Plasma-Kreatinin und/oder Abnahme der Kreatinin Clearance.

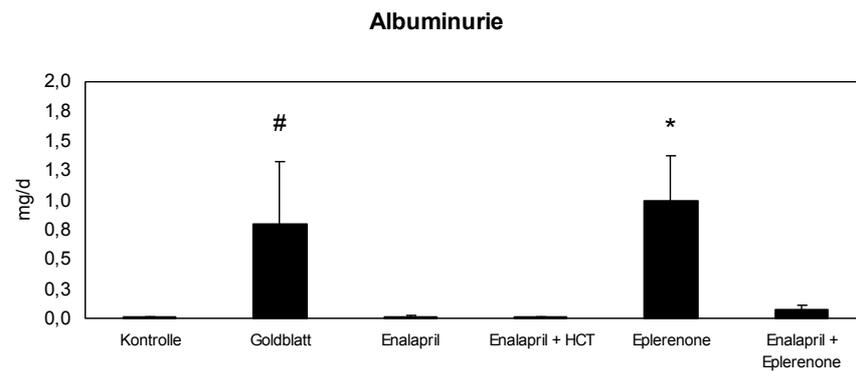
Um hypertensive Schäden feststellen zu können, bestimmten wir die Albuminurie im Urin. Goldblatt Tiere zeigten eine signifikant erhöhte Albuminurie. Enalapril, Enalapril + HCT und Enalapril + Eplerenone senkten signifikant die Albuminurie. Eplerenone in Monotherapie hatte keinen Effekt.

Ferner bestimmten wir im Serum die Aldosteronkonzentration. Durch antagonistische Blockade des Aldosteronrezeptors mittels Eplerenone nimmt die Aldosteronkonzentration im Serum massiv zu.

	Plasma - Kreatinin (mg/dl)	Kreatinin - Clearance (ml/min)
Kontrolle	0,34 ± 0,01	3,3 ± 0,2
Goldblatt	0,40 ± 0,02	2,8 ± 0,3
Enalapril	0,42 ± 0,02	2,6 ± 0,1
Enalapril + HCT	0,42 ± 0,03	2,6 ± 0,2
Eplerenone	0,41 ± 0,02	2,8 ± 0,3
Enalapril + Eplerenone	0,41 ± 0,02	2,9 ± 0,2

Tab.5: Plasma-Kreatinin und Kreatinin Clearance.

A



B

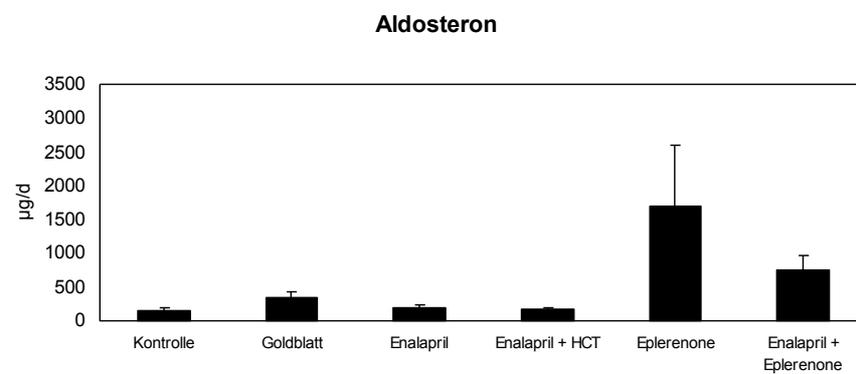


Abb.13: Albuminurie nach sechswöchiger Therapie (A): Die antihypertensive Therapie mit Enalapril reduziert die Albuminurie. Aldosteronkonzentration nach sechswöchiger Therapie (B): Deutliche Zunahme der Aldosteronkonzentration unter Eplerenone Monotherapie. Da die Standardabweichung sehr groß ist, sind keine signifikanten Werte zu erzielen.

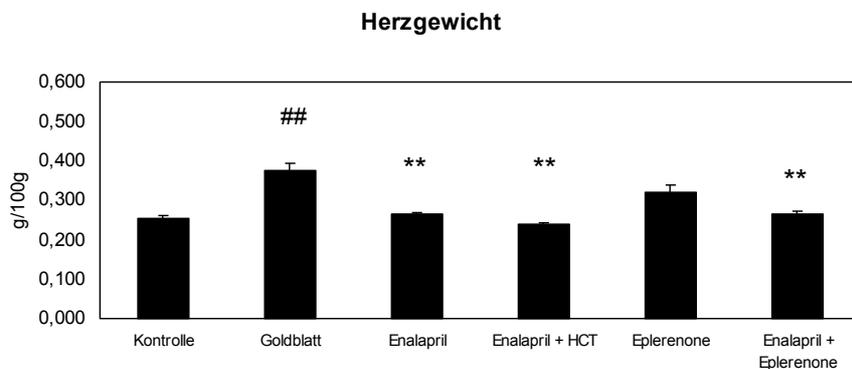
*= $p < 0.05$ vs. Kontrolle, #= $p < 0.001$ vs. Kontrolle

3.12 Organveränderungen

Nach Organentnahme bestimmten wir das Herzgewicht und fertigten Histologien der Aorta an. In der Gruppe der unbehandelten hypertensiven Tiere (Goldblatt) ergaben die Messungen eine deutliche Hypertrophie des Herzens im Vergleich zu den Kontrolltieren. Dieser Effekt zeigte sich unter der Therapie mit Enalapril nicht. Sowohl in Monotherapie, als auch in Kombination mit HCT bzw. Eplerenone kommt es zu einem signifikant geringeren Herzgewicht im Vergleich zu den unbehandelten hypertensiven Tieren.

Anhand der angefertigten Histologien konnten wir den Aortenwanddurchmesser per Morphometrie bestimmen. Nach sechswöchiger hypertensive Therapie nimmt der Aortendurchmesser in der Gruppe der unbehandelt hypertensiven Tiere signifikant zu. In den Gruppen unter Enalapril Therapie kommt es dagegen zu einer signifikanten Reduktion der Aortenwanddicke.

A



B

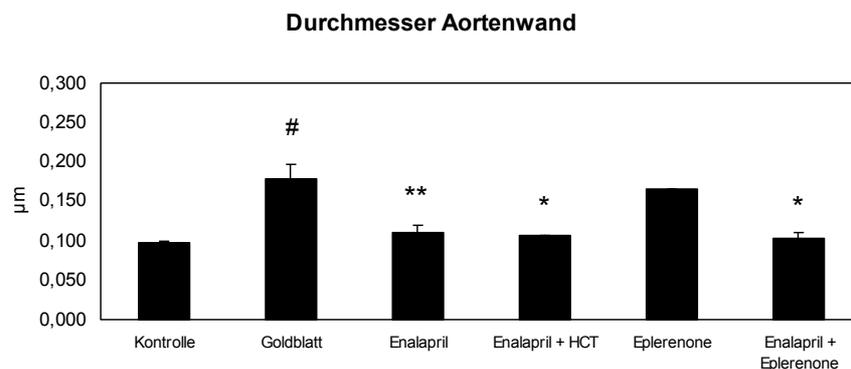


Abb.14: Bestimmung des Herzgewichts (A) und des Aortendurchmessers (B): Die antihypertensive Therapie mit Enalapril verhindert eine Hypertrophie des Herzens und der Aorta sowohl in Monotherapie, als auch in Kombination mit HCT und Eplerenone.

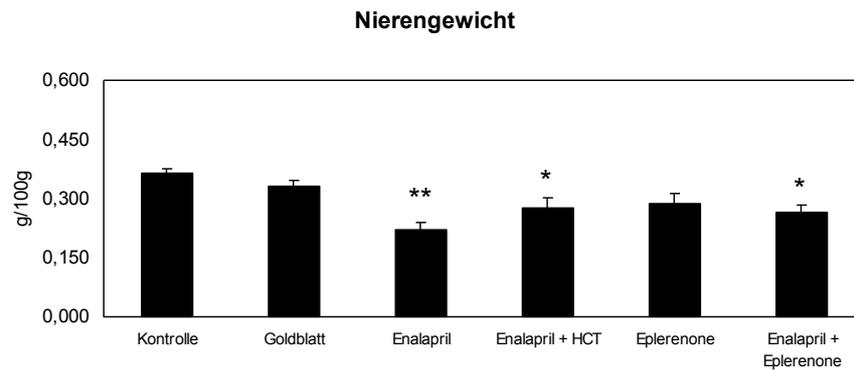
#= $p < 0,005$ vs. Kontrolle, ##= $p < 0,001$ vs. Kontrolle, *= $p < 0,05$ vs. Goldblatt, **= $p < 0,005$ vs. Goldblatt.

3.13 Nierengewicht und glomeruläre Größe

Zum Ende der Therapie wurde das Gewicht der geclippten Niere bestimmt. Es zeigte sich eine Atrophie der Niere unter antihypertensiver Therapie mit Enalapril. Dies konnten wir in allen mit Enalapril behandelten Tieren nachweisen.

Um die Atrophie der geclippten Niere zu spezifizieren, haben wir die Glomerulie morphometriert. Weder bei den unbehandelt hypertensiven Tieren, noch unter Eplerenone ließen sich atrophische Veränderungen ausmessen. Die Therapie mit Enalapril und Enalapril + HCT führte jedoch zu einer signifikanten Größenabnahme der Glomerulie.

A



B

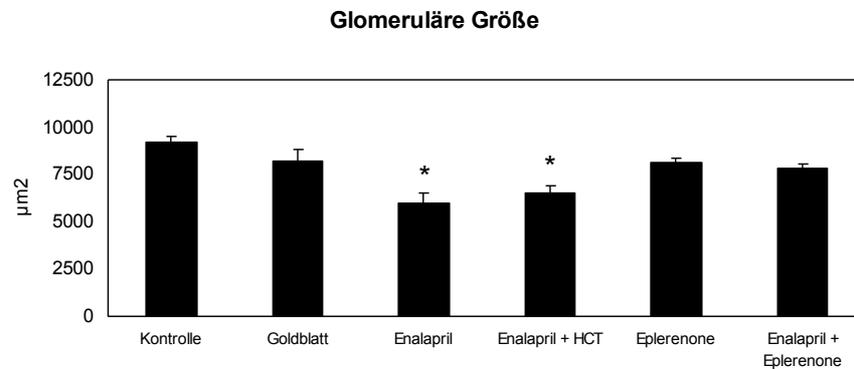


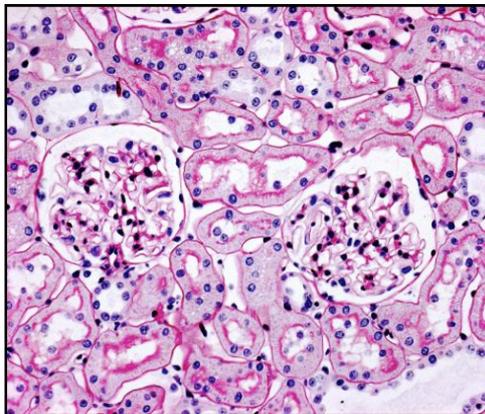
Abb.15: Unter antihypertensiver Therapie mit Enalapril kommt es zu einer Atrophie der Niere (A) und der Glomerulie (B) auf der geclippten Seite. Die Kombination Enalapril mit Eplerenone vermindert die Größenabnahme der Glomerulie.

*= $p < 0.05$ vs. Goldblatt, **= $p < 0.001$ vs. Goldblatt

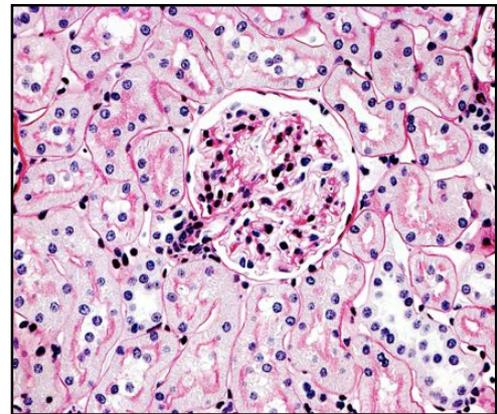
3.14 Morphologische Veränderungen der stenosierten Niere

Nach sechswöchiger Therapie wurden PAS-gefärbte Nierenschnitte erstellt. Es zeigte sich bei den normotensiven Kontrollen keine Veränderung der tubulointerstitiellen Morphologie, während bei den unbehandelten hypertensiven Ratten (Goldblatt-Gruppe) in der geclippten Niere vereinzelt tubuläre Schäden nachweisbar waren. Unter antihypertensiver Therapie mit Enalapril entstanden massive interstitielle Infiltrationen und tubulärer Atrophie. Dieser Effekt zeigte sich weniger ausgeprägt in der Kombination mit Eplerenone. Zwar lassen sich auch in dieser Gruppe tubuläre Schäden und eine Vermehrung des Interstitiums darstellen, das Ausmaß ist aber deutlich geringer als Enalapril in Monotherapie.

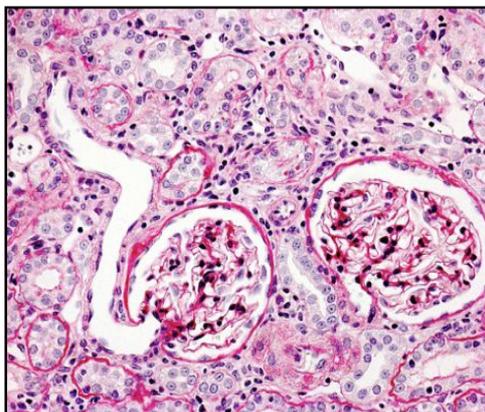
A: Kontrolle



B: Goldblatt



C: Enalapril



D: Enalapril + Eplerenone

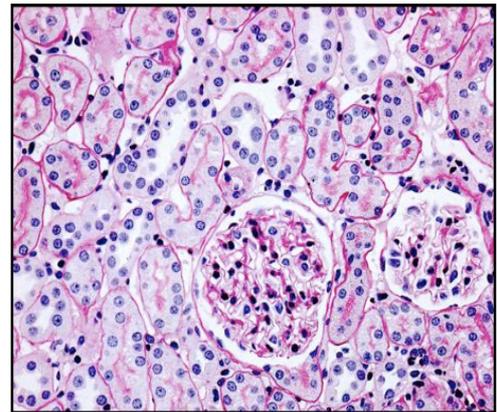


Abb.16: Aufnahmen der PAS gefärbten Nierenhistologien der geclippten Niere. Keine Schäden der Tubuli der Kontroll-Gruppe lichtmikroskopisch zu entdecken (A). In der geclippten Niere der Goldblatt Gruppe sind dezente tubulointerstitielle Schäden auszumachen (B). Massive tubulointerstitielle Schäden bei Enalapril Monotherapie, mit Zell Clustern im Interstitium (C), deutlich geringeres Ausmaß der tubulären Schäden in der Kombination Enalapril + Eplerenone (D)

3.15 Interstitielle und tubuläre Veränderungen der Niere

Eine Zunahme des interstitiellen Anteils bei gleichzeitiger Abnahme des tubulären Volumens ist ein guter Marker für renale Schäden in der geclippten Niere. Anhand der PAS gefärbten Nierenschnitte konnten wir durch Auszählung eines Rasters das interstitielle Volumen und die Verteilung von Tubulus und Tubuluslumen ermitteln. In den Tierkollektiven der unbehandelt hypertensiven Tiere (Goldblatt) und unter Eplerenone zeigten sich keine Unterschiede zu den Tieren der Kontrollgruppe. Unter antihypertensiver Therapie mit Enalapril kam es zu einer signifikanten Zunahme des interstitiellen Volumens in der geclippten Niere, bei gleichzeitiger Verminderung des tubulären Anteils. Die Werte zwischen Enalapril Monotherapie und in der Kombination mit HCT unterschieden sich nicht voneinander. Dagegen kam es in der Kombination Enalapril + Eplerenone zu einer deutlich geringeren Ausprägung des interstitiellen Volumens.

Tab.6: Interstitielles Volumen, Tubuluszellen und Tubuluslumen.

	Interstitielles Volumen (%)	Tubulus - zellen (%)	Tubulus - lumen (%)
Kontrolle	5.2 ± 1	65.1 ± 2	11,3 ± 1
Goldblatt	10,6 ± 1	60,8 ± 2	7,8 ± 1
Enalapril	37 ± 4 *	42,3 ± 4 *	5,9 ± 1
Enalapril + HCT	38,1 ± 5 *	33 ± 5 *	9,5 ± 1
Eplerenone	10,2 ± 1	63,3 ± 2	8,5 ± 1
Enalapril + Eplerenone	18,4 ± 3 ##	52,2 ± 2 #	8,9 ± 1 #

*=p<0.001 vs. Goldblatt

#= p<0.05 vs. Enalapril, ##=p<0.005 vs. Enalapril

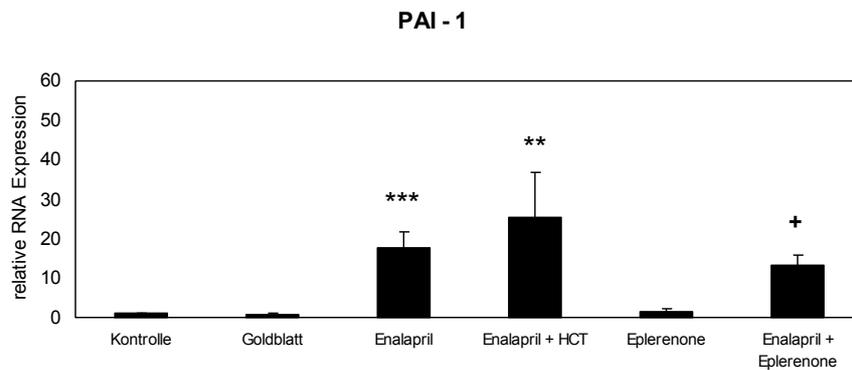
3.16 Entzündung und Fibrose in der Niere

Es wurden Real-time PCR Analysen der mRNA des gesamt Nierenkortexes der geclippten Niere durchgeführt und folgende Marker bestimmt: Plasminogen-Aktivator-Inhibitors 1, als Marker für die renale Fibrose und das Chemokin Mig als Th1 Immunantwort und der dazu korrespondierende Rezeptor CXCR3, die bei entzündlichen Prozessen vermehrt exprimiert werden.

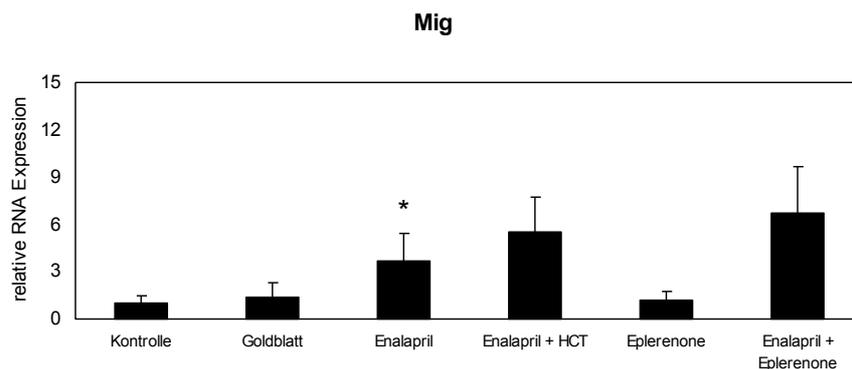
Insgesamt zeigten die Daten eine sehr breite Streuung der Ergebnisse. Die Ergebnisse der PAI-1 Messung ergaben, dass es unter antihypertensiver Therapie mit Enalapril zu einer gesteigerten Expression von PAI-1 kommt. Dagegen zeigten die Ergebnisse von Enalapril + Eplerenone signifikant weniger PAI-1 Expression.

Die Daten für Mig und CXCR 3 sind zu uneinheitlich, um genaue Schlüsse ziehen zu können. Es lässt sich lediglich eine Tendenz feststellen: Unter Enalapril Therapie ist die Expression von Mig und CXCR3 erhöht.

A



B



C

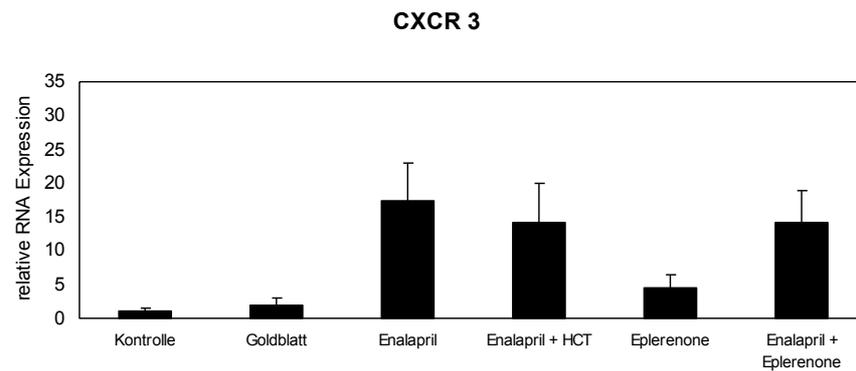
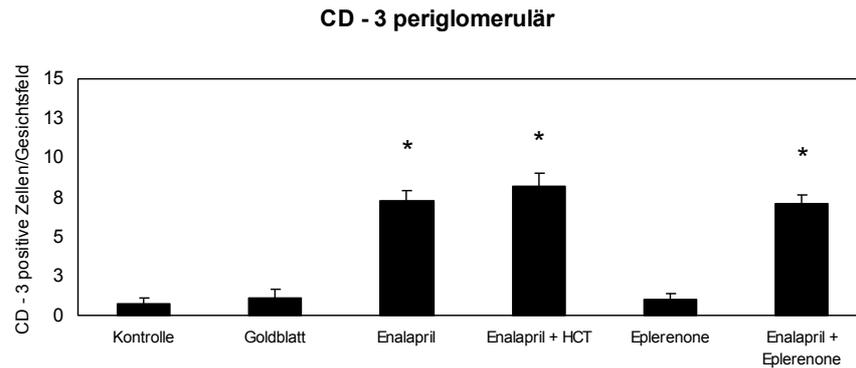


Abb.17: RT PCR Ergebnis für PAI-1, Mig und CXCR3. Unter Enalapril kommt es zu einer signifikanten Steigerung der Expression für PAI-1 und Mig (A und B). Unter der Kombination Enalapril + Eplerenone kommt es dagegen zu signifikant weniger Expression für PAI-1 (A). Die Daten für CXCR 3 waren sehr uneinheitlich, sodass nicht eindeutig eine Aussage zu treffen ist (C). *= $p < 0.05$ vs. Goldblatt, **= $p < 0.01$ vs. Goldblatt, ***= $p < 0.001$ vs. Goldblatt, += $p < 0.005$ vs. Enalapril

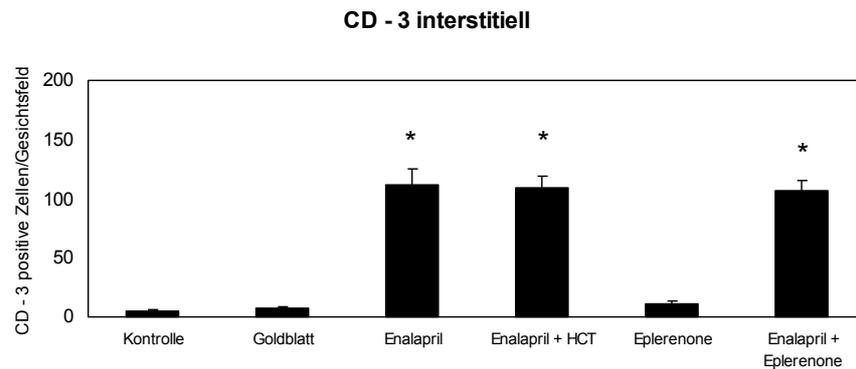
3.17 Immunhistochemische Veränderungen der Niere

Die Auswertung der Immunhistochemie der Nierenschnitte zeigte eine Zunahme der CD-3 positiven T-Zellen und ED-1 Monocyten/Makrophagen unter Blutdrucksenkung mittels Enalapril in der geglipten Niere. Dabei ließen sich die gefärbten Zellen sowohl periglomerulär als auch interstitiell nachweisen, jedoch kaum intraglomerulär. Dabei kam es sowohl unter Enalapril Monotherapie, als auch in Kombination mit Eplerenone zu einer massiven Infiltration der Entzündungszellen.

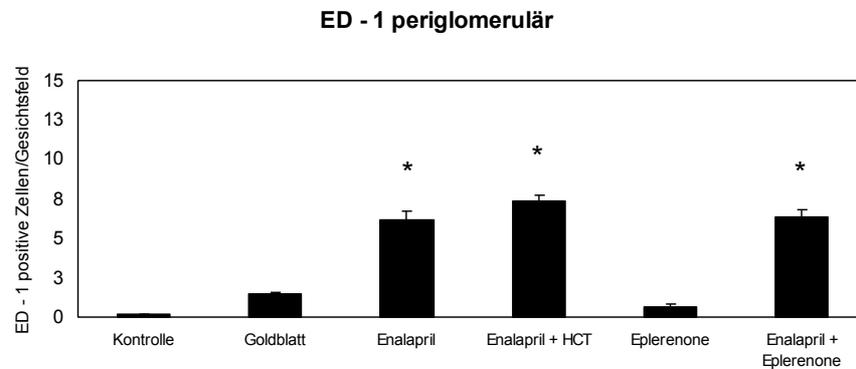
A



B



C



D

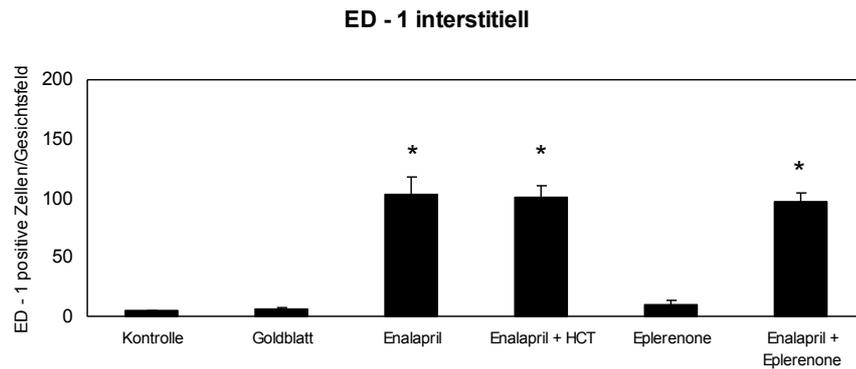


Abb.18: Auszählung der CD-3 und ED-1 positiven Zellen durch immunhistochemisch angefärbte Nierenschnitte. Deutlich vermehrte Konzentration von CD-3 positiven Zellen, sowohl periglomerulär, als auch interstitiell unter Enalapril Medikation (A und B). Ein ähnliches Bild zeigte sich bei Anfärbung der ED-1 positiven Zellen. Auch hier kommt es zu einer signifikant höheren Anzahl an positiven Zellen durch Einsatz von Enalapril (C und D). In der hypertensiven unbehandelten Gruppe (Goldblatt) und unter Eplerenone Monotherapie kommt es weder zu einer gesteigerten CD-3 noch zu einer gesteigerten ED-1 Anzahl der positiven Zellen pro Gesichtsfeld.

*= $p < 0.001$ vs. Goldblatt

4. Diskussion

Die Hemmung des Renin-Angiotensin-Systems (RAS) spielt im klinischen Alltag der pharmakologischen Therapie verschiedenster Erkrankungen und Organsysteme eine zentrale Rolle. Einen großen Stellenwert nehmen hierbei die ACE-Hemmer ein. So sind ACE-Hemmer Mittel der Wahl bei Patienten mit Herzinsuffizienz, da sie entscheidend die Prognose verbessern (61). Nach einem Myokardinfarkt bremsen sie die ungünstigen Umbau- und Anpassungsvorgänge des Herzens („Remodeling“) und verhindern dadurch die Progression einer Linksherzinsuffizienz (26). Bei der diabetischen Nephropathie sollte es zu einer möglichst frühzeitigen antihypertensiven Therapie mit ACE-Hemmern kommen, da sie die Progression der diabetischen Nephropathie zur terminalen Niereninsuffizienz verzögern und die kardiovaskuläre Mortalität senken (37).

Allerdings hat sich auch gezeigt, dass es durch Hemmung des RAS bei Patienten mit verminderter renaler Perfusion, zum Beispiel durch eine Nierenarterienstenose, zu einer Verschlechterung der Nierenfunktion kommt (65).

Bereits in vorangegangenen Arbeiten wurden sowohl von unserer Arbeitsgruppe als auch von anderen (22, 49, 71), die tubulointestinalen Schäden durch antihypertensive Therapie in der geclippten Niere beschrieben. Dabei zeigte sich, dass es zu einer Hochregulation von Renin und des (Pro)Renin-Rezeptors in der geclippten Niere kommt. Die Tatsache, dass eine dosisabhängige Steigerung von Renin und des Rezeptors zu einer dosisabhängigen Schädigung in der geclippten Niere führt, verstärkt den Eindruck, dass Renin ein wesentlicher Baustein in der Genese der Profibrose ist (25, 58).

Dennoch ist bislang wenig über die Mechanismen des komplexen Zusammenspiels der Mediatoren bekannt, die in der geclippten Niere zu Entzündung und Fibrose führen.

In der vorliegenden Arbeit wendeten wir das 2 Nieren, 1 Clip Hochdruckmodell von Goldblatt bei Ratten an, um die pathophysiologischen Zusammenhänge des induzierten Nierenschadens darzustellen. Zur Blutdrucksenkung setzten wir den ACE Hemmer Enalapril ein. In bereits vorangegangenen Arbeiten unserer Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass durch Applikation eines Vasopeptidase-Hemmers in der geclippten Niere inflammatorisch und profibrotische Kaskaden ausgelöst werden (69). Wir kombinierten in diesem Versuchsaufbau Enalapril mit dem Aldosteronantagonisten Eplerenone und Enalapril mit dem Decoypeptid um zu untersuchen, ob Inflammation und Profibrose durch Aldosteron- beziehungsweise Proreninblockade inhibiert werden können.

Die Wirkung des Decoypeptides

Während der vierwöchigen Therapie zeigte sich, dass in der Kombination Enalapril und Decoypeptid der Blutdruck ähnlich signifikant gesenkt werden konnte, wie unter Enalapril Monotherapie. Es wurden in beiden Gruppen zum Ende normotensive Werte erreicht. Von entscheidender Bedeutung war aber die Wirkung auf die geclippte Niere. Enalapril induziert in der geclippten Niere, wie bereits erwähnt, inflammatorische und fibrotische Prozesse. Der Einsatz des Decoypeptides verhinderte diesen Prozess nicht. In den PAS angefärbten Nierenhistologien der geclippten Niere waren bei beiden Tiergruppen massive interstitielle Erweiterungen und tubuläre Atrophien zu sehen. Anhand der morphometrischen Quantifizierung zeigte sich korrelierend dazu eine Zunahme des interstitiellen Volumens. In der RT-PCR Analyse des Fibrose Marker Plasminogen-Aktivator-Inhibitor-1(Pai-1) kam zu einer Zunahme der mRNA Expression in beiden Gruppen.

Wie verhielt es sich mit der lokalen Prorenin und Reninkonzentration in der geclippten Niere? Durch die gesetzte Stenose der rechten Nierenarterie wurde eine Minderperfusion mit reflektorischer Zunahme der Reninkonzentration erzeugt. Dies konnten wir anhand erhöhter Renin Plasmaspiegel messen. Ebenfalls zeigten sich erhöhte Prorenin Plasmaspiegel. Allerdings kam es in der geclippten Niere lediglich zu einer Konzentrationszunahme von Renin, wohingegen das Prorenin laborchemisch nicht nachweisbar war.

Zusammenfassend ist zum Einsatz des Decoypeptides in dieser Studie zu sagen: Das Decoypeptid kann die tubulointestinalen Schäden der geclippten Niere der mit Enalapril therapierten Goldblatt Ratten nicht aufhalten.

Folgende Überlegungen müssen wir hieraus ziehen:

Möglicherweise ist die Wirkung des Decoypeptides abhängig von der Dosierung des Decoypeptides. Wir haben in vorliegender Arbeit keine Dosis-Wirkungskurve durchgeführt. In dieser Studie haben wir allerdings die exakt gleich Dosierung und Applikation verwendet, wie die Studienprotokolle zu der gezeigten kardiovaskulären und renalen Protektion in hypertensiven und diabetischen Ratten in vorangegangenen Arbeiten (19, 20, 21).

Es ist daher wahrscheinlich, dass die nichtproteolytische Aktivierung des Prorenin keinen oder minimalen Einfluss auf die Ausbildung von Inflammation und Fibrose in der geclippten Niere unter Enalapriltherapie hat.

Erhöhtes totales und nichtproteolytisch aktiviertes Prorenin konnte in Nieren und Herzen von diabetischen und spontan hypertensiven Ratten in der Immunhistochemie nachgewiesen werden, welche mit dem Decoypeptid behandelt wurden. Dadurch konnte der renale und kardiale Schaden vermindert werden (19, 21, 60). In unserer Studie konnte das Prorenin in der geclippten Niere der hypertensiven Ratten nicht nachgewiesen werden, bei jedoch erhöhter Prorenin Plasmakonzentration. Dies lässt die Möglichkeit zu, dass zirkulierendes Prorenin an den renalen (Pro)Renin-Rezeptor bindet.

Die Ergebnisse dieser Studie schließen eine Rolle des (Pro)Renin-Rezeptors in der Genese der renalen Schäden in der geclippten Niere nicht aus, da das Decoypeptid die Bindung von Renin auf den (Pro)Renin-Rezeptor nicht verhindert. Um den Beweis zu erbringen, dass der (Pro)Renin-Rezeptor eine profibrotische Rolle in der geclippten Niere spielt, wäre eine Möglichkeit, den Blutdruck in Goldblatt hypertensiven (Pro)Renin-Rezeptor Knockout Mäusen zu senken. In Experimenten zeigte sich, dass eine (Pro)Renin-Rezeptor Knockout Maus nicht überlebensfähig ist. Eine gefloxt (Pro)Renin-Rezeptor Knockout Maus wurde inzwischen entwickelt. Die publizierten Arbeiten zeigen aber, dass die Zellen, in denen der (Pro)Renin-Rezeptor ausgeknockt wurde, (bisher in Podozyten und Kardiomyozyten) zugrunde gehen. Damit sind auch gefloxt (Pro)Renin-Rezeptor Knockout Mäuse nicht geeignet, die Frage einer Nephroprotektion zu beantworten (47).

Die Wirkung des Aldosteronantagonisten Eplerenone

Unter sechswöchiger Therapie wurde der Blutdruck mit Enalapril auf normotensive Werte gesenkt. Wie erwartet, erzeugte die Medikation mit Enalapril in der geclippten Niere einen massiven renalen Schaden. In den PAS gefärbten Nierenschnitten zeigten sich deutliche tubuläre Atrophien und interstitielle Infiltrationen, die Auszählung des interstitiellen Volumens quantifizierte dies. In den RT-PCR Analysen kam es zu einer signifikant gesteigerten Expression profibrotischer und proinflammatorischer Marker und die Immunhistochemie zeigte eine Zunahme von CD-3 positiven T-Zellen und ED1 positiven Monocyten/Makrophagen.

Die Ergebnisse der PAI-1 Expression und der Bestimmung des interstitiellen Volumens ergaben für die Kombination Enalapril + Eplerenone jedoch signifikant weniger renalen Schaden in der geclippten Niere als unter Enalapril Monotherapie.

Antifibrotische Effekte von Eplerenone sind beschrieben (12, 14). Die Pathomechanismen hierfür sind jedoch noch unklar. Vermutlich hat die nephroprotektive Wirkung von Eplerenone auf die geclippte Niere aber keine antiinflammatorischen Prozesse als Ursache, da die Monocyten/Makrophagen und T-Zell Infiltration zu keiner Veränderung unter Enalapril + Eplerenone führte.

Die Wirkung von Eplerenone war kein unspezifischer Diuretikaeffekt, da die Kombination Enalapril + HCT als Diuretikum keine Nephroprotektion zeigte, sondern vielmehr zu einer Aggravation des renalen Schadens führte.

5. Zusammenfassung

Die Ergebnisse dieser Studie zeigen, dass die Therapie mit dem Decoypeptid, welches die Bindung von Prorenin an seinen Rezeptor verhindert, die ACE - Hemmer induzierte Schädigung der geclippten Niere bei renovaskulärer Hypertonie nicht hemmt. Dahingegen vermindert die Aldosteronblockade durch Eplerenone teilweise den ACE-Hemmer induzierten fibrotischen Umbau. Eplerenone beeinflusst jedoch nicht die entzündlichen Veränderungen in der geclippten Niere.

6. Literaturverzeichnis

- 1 Anderson S, Rennke HG, Brenner B. Therapeutic advantage of converting enzyme inhibitors in arresting progressive renal disease associated with systemic hypertension in the rat. *J Clin Invest* 77: 1993–2000, 1986
- 2 Carey RM. Update on the role of the AT2 receptor. *Curr Op in Nephrol Hypertens* 14: 67–71, 2005
- 3 Craft J. Eplerenone (Inspra), a new aldosterone antagonist for the treatment of systemic hypertension and heart failure. *Proc Bayl Univ Med Cent* 17(2): 217-220, 2004
- 4 Bauer JH, Reams GP. Hemodynamic and renal function in essential hypertension during treatment with enalapril. *Am J Med* 79: 10-13, 1985
- 5 Bhoola, KD, Figueroa CD, Worthy K. Bioregulation of kinins: kallikreins, kininogens and kininases. *Pharmacol Rev* 44: 1-80, 1992
- 6 Braun-Menendez E, Fasciolo JC, Leloir LF, Munoz JM. The substance causing hypertension. *J Physiol (Lon)* 98: 283-298, 1940
- 7 Danser AHJ. Prorenin: back into the arena. *Hypertension* 47: 824-826, 2006
- 8 Danser AHJ. (Pro)Renin Receptor and Vascular H – ATPase. *Hypertension* 54: 216-219, 2009
- 9 Danser AHJ, Deinum J. Renin, Prorenin and the Putative (Pro)renin Rezeptor. *Hypertension* 46: 1069-1076, 2005
- 10 Danser AHJ, Derkx FHM, Schalekamp MADH, Hense HW, Riegger GAJ, Schunkert H. Determinants of interindividual variation of renin and prorenin concentrations: evidence for a sexual dimorphism of (pro)renin levels in humans. *J Hypertens* 16: 853–862, 1998
- 11 Décarie A, Raymond P, Gervais N, Couture R, Adam A. Serum interspecies differences in metabolic pathways of bradykinin and [des-Arg⁹]BK: influence of enalaprilat. *Am J Physiol* 270: 1340-1347, 1996
- 12 De Mello WC. Beneficial effect of eplerenone on cardiac remodelling and electrical properties of the failing heart. *J Renin, Angiotensin and Aldosterone Syst* 7: 40-46, 2006
- 13 Dumoulin M-J, Adam A, Blais Jr C, Lamontagne D. Metabolism of bradykinin by the rat coronary vascular bed. *Cardiovasc Res* 38: 229-236, 1998
- 14 Franco V, Chen YF, Feng JA, Li P, Wang D, Hasan E, Oparil S, Perry GJ. Eplerenone prevents adverse cardiac remodelling induced by pressure overload in atrial natriuretic peptide-null mice. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 33: 773-779, 2006
- 15 Goldblatt H, Lynch J, Hanzal RF, Summerville WW. Studies on experimental hypertension. I. The production of persistent elevation of systolic blood pressure by means of renal ischemia. *J Exp Med* 59: 347-376, 1934
- 16 Hair PI, Scott LJ, Perry CM. Fixed-dose combination lercanidipine/enalapril. *Drugs* 67: 95–106, 2007
- 17 Hall JM. Bradykinin receptors: pharmacological properties and biological roles. *Pharmacol Ther* 56: 131-190, 1992
- 18 Huang Y, Wongamorntham S, Kasting J. Renin increases mesangial cell transforming growth factor-beta1 and matrix proteins through receptor-mediated, angiotensin II-independent mechanisms. *Kidney Int* 69: 105-113, 2006
- 19 Ichihara A, Kaneshiro Y, Takemitsu T. Contribution of nonproteolytically activated prorenin in glomeruli to hypertensive renal damage. *J Am Soc Nephro* 17: 2495-2503, 2006
- 20 Ichihara A, Suzuki F, Nakagawa T. Prorenin receptor blockade inhibits development of glomerulosclerosis in diabetic angiotensin II type 1a receptor-deficient mice. *J Am Soc Nephrol* 17: 1950-1961, 2006

- 21 Ichihara A, Hayashi M, Kaneshiro Y, Suzuki F, Nakagawa T, Tada Y, Koura Y, Nishiyama A, Okada H, Uddin MN, Nabi AHMN, Ishida Y, Inagami T, Saruta T. Inhibition of diabetic nephropathy by a decoy peptide corresponding to the “handle” region for nonproteolytic activation of prorenin. *J Clin Invest* 114: 1128-1135, 2004
- 22 Jackson B, Franze L, Sumithran E, Johnston CL. Pharmacologic nephrectomy with chronic angiotensin converting enzyme inhibitor treatment in renovascular hypertension in the rat. *J Lab Clin Med* 115: 21-27, 1990
- 23 Kaneshiro Y, Ichihara A, Sakoda M, Takemitsu T, Nabi AH, Uddin MN, Nakagawa T, Nishiyama A, Suzuki F, Inagami T, Itoh H. Slowly Progressive, Angiotensin III Independent Glomerulosclerosis in Human (Pro)renin Receptor-Transgenic Rats. *J Am Soc Nephrol* 18: 1789-1795, 2007
- 24 Kaneto H, Moriessey J, Mc Cracken R, Reyes A, Klahr S. Enalapril reduces collagen typ IV synthesis and expansion of the interstitium in the obstructed rat kidney. *Kidney Int* 45: 1637-1647, 1994
- 25 Krebs C, Hamming I, Sadaghiani S, Steinmetz OM, Meyer-Schwesinger C, Fehr S, Stahl RAK, Garrelds IM, Danser AHJ, van Goor H, Contrepas A, Nguyen G, Wenzel UO. Antihypertensive therapy upregulates renin and (pro)renin receptor in the clipped kidney of Goldblatt hypertensive rats. *Kidney Int* 72: 725-730, 2007
- 26 Lamas G, Flaker G, Mitchell G, Smith Jr S, Gersh B, Wun CC, Moyé L, Rouleau JL, Rutherford JD, Pfeffer MA, Braunwald E. Effect of Infarct Artery Patency on Prognosis After Acute Myocardial Infarction. *Circulation* 92: 1101-1109, 1995
- 27 Linz W, Wiemer G, Gohlke P, Unger T, Schölkens BA. Contribution of kinins to the cardiovascular actions of angiotensin-converting enzyme inhibitors. *Pharmacol Rev* 47: 25-49, 1995
- 28 Liu YH, Yang XP, Sharov VG, Nass O, Sabbah HN, Peterson E, Carretero OA. Effects of angiotensin-converting enzyme inhibitors and angiotensin II type 1 receptor antagonists in rats with heart failure. Role of kinins and angiotensin II type 2 receptors. *J Clin Invest* 99: 1926-1935, 1997
- 29 Ljungman S, Aurell M, Hartford H, Wikstrand J, Berglund G. Renal function before and after withdrawal of longterm treatment in primary hypertension. *Kidney Int* 29: 251, 1986
- 30 Lombes M, Farman N, Bonvalet J, Zennaro M. Identification and role of aldosterone receptors in the cardiovascular system. *Ann Endocrinol (Paris)* 61: 41-46, 2000
- 31 Lumbers ER. Activation of renin in human amniotic fluid by low pH. *Enzymologia* 40: 329-336, 1971
- 32 McKelvie RS, Yusuf S, Pericak D, Avezum A, Burns RJ, Probstfield J, Tsuyuki RT, White M, Rouleau J, Latini R, Maggioni A, Young J, Pogue J. Comparison of candesartan, enalapril, and their combination in congestive heart failure. *Circulation* 100: 1056-1064, 1999
- 33 McMahon EG. Recent studies with eplerenone, a novel selective aldosterone receptor antagonist. *Curr Opin Pharmacol* 1: 190-196, 2001
- 34 Miller AB, Srivastava P. Angiotensin receptor blockers and aldosterone antagonists in chronic heart failure. *Cardiol Clin* 19: 195-202, 2001
- 35 Nguyen G, Delarue F, Burckle C. Pivotal role of the renin/prorenin receptor in angiotensin II production and cellular responses to renin. *J Clin Invest* 109: 1417-1427, 2002
- 36 Nishiyama A, Yoshizumi M, Rahman M. Effects of AT₁ receptor blockade on renal injury and mitogen-activated protein activity in Dahl salt-sensitive rats. *Kidney Int* 65: 972-981, 2004

- 37 Nishiyama A, Nakagawa, T, Kobori H, Nagai Y, Okada N, Konishi Y, Morikawa T, Okumura M, Meda I, Kiyomoto H, Hosomi N, Mori T, Ito S, Imanishi M. Strict angiotensin blockade prevents the augmentation of intrarenal angiotensin II and podocyte abnormalities in type 2 diabetic rats with microalbuminuria. *J Hypertens* 26(9): 1849–1859, 2008
- 38 Nyengaard JR. Stereologic methods and their application in kidney research. *J Am Soc Nephrol* 10: 1100-1123, 1999
- 39 Page JH, Hellmer DM. A crystalline pressor substance (angiotensin) resulting from the reaction between renin and renin-activator. *J Exp Med* 71: 29-42, 1940
- 40 Panzer U, Steinmetz OM, Reinking RR, Meyer TN, Fehr S, Schneider A, Zahner G, Wolf G, Helmchen U, Schaerli P, Stahl RAK, Thaiss F. Compartment specific expression and function of the chemokine IP-10/CXCL 10 in a model of renal endothelial microvascular injury. *J Am Soc Nephrol* 17: 454-464, 2006
- 41 Peart WS, Gordon DB, Cook WF, Pickering GW. Distribution of renin in the rabbit kidney. *Circulation* 14: 981, 1956
- 42 Perry HM, Miller Jr. JP, Fornoff JR. Early predictors of 15-year end-stage renal disease in hypertensive patient. *Hypertension* 25: 587-594, 1999
- 43 Pfeffer MA, Braunwald E, Moyé LA, Basta L, Brown EJ, Cuddy TE, Davis BR, Geltman EM, Goldman S, Flaker GC, Klein M, Lamas GA, Packer M, Rouleau J, Rouleau JL, Rutherford JR, Wertheimer JH, Hawkins CM. Effect of captopril on mortality and morbidity in patients with left ventricular dysfunction after myocardial infarction: results of the survival and ventricular enlargement trial. *N Engl J Med* 327: 669-677, 1992
- 44 Raut R, Rouleau JL, Blais Jr. C, Gosselin H, Molinaro G, Sirois MG, Lepage Y, Crine P, Adam A. Bradykinin metabolism in the postinfarcted rat heart: role of ACE and neutral endopeptidase 24.11. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 276: 1769-1779, 1999
- 45 Ravid M, Brosh D, Levi Z. Use of enalapril to attenuate decline in renal function in normotensive, normoalbuminuric patients with type 2 diabetes mellitus. A randomized, controlled trial. *Ann Intern Med* 128: 982–988, 1998
- 46 Razga Z, Nyengaard JR. Up- and down-regulation of angiotensin II AT1-A and AT1-B receptors in afferent and efferent rat kidney arterioles. *J Renin-Angiotensin-Aldosterone Syst* 9: 196-201, 2008
- 47 Riediger F, Quack I, Qadri F, Hartleben B, Park JK, Potthoff SA, Sohn D, Sihn G, Rousselle A, Fokuhl V, Maschke U, Purfürst B, Schneider W, Rump LC, Luft FC, Dechend R, Bader M, Huber TB, Nguyen G, Muller DN. Prorenin receptor is essential for podocyte autophagy and survival. *J Am Soc Nephrol* 22:2193-202, 2011
- 48 Rocha R, Stier Jr. CT, Kifor I, Ochoa-Maya MR, Rennke HG, Williams GH, Adler GK: Aldosterone, a mediator of myocardial necrosis and renal arteriopathy. *Endocrinology* 141: 3871–3878, 2000
- 49 Rodriguez-Iturbe B, Quiroz Y, Kim CH, Vaziri ND. Hypertension induced by aortic coarctation above the renal arteries is associated with immune cell infiltration of the kidneys. *Am J Hypertens* 18: 1449-1456, 2005
- 50 Ruster C, Wolf G. Renin-Angiotensin-Aldosterone System and Progression of Renal Disease. *J Am Soc Nephrol* 17: 2985-2991, 2006
- 51 Saris JJ, van den Eijnden MM, Lamers JM. Prorenin-induced myocyte proliferation: no role for intracellular angiotensin II. *Hypertension* 39: 573–577, 2002
- 52 Schalekamp MA, Danser AH. Angiotensin II production and distribution in the kidney: I. A kinetic model. *Kidney Int* 69: 1543-1552, 2006
- 53 Schalekamp MA, Danser AH. Angiotensin II production and distribution in the kidney: II. Model-based analysis of experimental data. *Kidney Int* 69: 1553-1557, 2006

- 54 Schiffrin, E. Effects of Aldosterone on the Vasculator. *Hypertension* 47: 312-318, 2006
- 55 Siddiqui AH, Ali Q, Hussain T. Protective Role of Angiotensin II Subtype 2 Receptor in Blood Pressure Increase in Obese Zucker Rats. *J Hypertension* 53: 256, 2008
- 56 Sielecki AR, Hayakawa K, Fujinaga M, Murphy ME, Fraser M, Muir AK, Carilli CT, Lewicki JA, Baxter JD, James MN. Structure of recombinant human renin, a target for cardiovascular-active drugs, at 2.5 Å resolution. *Science* 243: 1346–1351, 1989
- 57 Skinner SL, Cran EJ, Gibson R, Taylor R, Walters WA, Catt KJ. Angiotensins I and II, active and inactive renin, renin substrate, renin activity, and angiotensinase in human liquor amnii and plasma. *Am J Obstet Gynecol* 121: 626–630, 1975
- 58 Steinmetz OM, Sadaghiani S, Panzer U, Krebs C, Meyer-Schwesinger C, Streichert T, Fehr S, Hamming I, van Goor H, Stahl RA, Wenzel U. Antihypertensive therapy induces compartment-specific chemokine expression and a Th1 immune response in the clipped kidney of Goldblatt hypertensive rats. *Am J Physiol Renal Physiol* 292: 876-887, 2007
- 59 Suzuki F. Human prorenin has “gate and handle” regions for its non-proteolytic activation. *J Biol Chem* 278: 22217–22222, 2003
- 60 Takahashi H, Ichihara A, Kaneshiro Y, Inomata K, Sakoda M, Takemitsu T, Nishiyama A, Itoh H. Regression of nephropathy developed in diabetes by (Pro)reninreceptor blockade. *J Am Soc Nephrol* 18: 2054-2061, 2007
- 61 The SOLVD Investigators. Effect of enalapril on survival in patients with reduced left ventricular ejection fractions and congestive heart failure. *N Engl J Med* 325: 293–302, 1991
- 62 Tobian L. Interrelationship of electrolytes, juxtaglomerular cells and hypertension. *Physiol Rev* 52: 395, 1960
- 63 Tobian L, Tomboulian A, Janecek J. The effect of high perfusion pressures on the granulation of juxtaglomerular cells in the isolated kidney. *J Clin Invest* 35: 605, 1959
- 64 Toffelmire EB, Slater K, Corvol P, Ménard J, Schambelan M. Response of plasma prorenin and active renin to chronic and acute alterations of renin secretion in normal humans. Studies using a direct immunoradiometric assay. *J Clin Invest* 83: 679–687, 1989
- 65 Toto RD, Mitchell HC, Lee HC, Milam C, Pettinger WA. Reversible renal insufficiency due to angiotensin converting enzyme inhibitors in hypertensive nephrosclerosis. *Ann Intern Med* 115: 513-519, 1991
- 66 Uddin MN, Nabi AH, Nakagawa T. Non-proteolytic activation of prorenin: activation by (pro)renin receptor and its inhibition by a prorenin prosegment, 'decoy peptide'. *Front Biosci* 13: 745-753, 2008
- 67 Wang YR, Alexander GC, Stafford RS. Outpatient hypertension treatment, treatment intensification, and control in Western Europe and the United States. *Arch Intern Med* 167: 141–147, 2007
- 68 Wenzel UO, Helmchen U, Schoeppe W, Schwietzer G. Combination treatment of enalapril with nitrendipine in rats with renovascular hypertension. *Hypertension* 23: 114–122, 1994
- 69 Wenzel UO. Angiotensin-converting enzyme inhibitors and progression of renal disease: evidence from clinical studies. *Contrib Nephrol* 135: 200–211, 2001
- 70 Wenzel UO, Thaiss F, Helmchen U, Stahl RAK, Wolf G. Angiotensin II infusion ameliorates the early phase of a mesangioproliferative glomerulonephritis. *Kidney Int* 62: 1020-1029, 2002
- 71 Wenzel UO, Wolf G, Jacob I, Schwegler C, Qasqas A, Amann K, Helmchen U, Stahl RAK. Beneficial and adverse renal and vascular effects of the vasopeptidase inhibitor omapatrilat in renovascular hypertensive rats. *Nephrol Dial Transplant* 18: 2005-2013, 2003

- 72 Wilson C, Byrom FB. Renal changes in malignant hypertension. *Lancet* 1: 136-139, 1939
- 73 Wilson DM, Luetscher JA: Plasma prorenin activity and complications in children with insulin-dependent diabetes mellitus. *N Engl J Med* 323: 1101-1106, 1990
- 74 Wolf G, Butzmann U, Wenzel UO. The renin-angiotensin system and progression or renal disease: From hemodynamics to cell biology. *Nephron Physiol* 93: 3 –13, 2003
- 75 Wolf G, Mueller E, Stahl RAK, Ziyadeh FN. Angiotensin II-induced hypertrophy of cultured murine proximal tubular cells is mediated by endogenous transforming growth factor-beta. *J Clin Invest* 92: 1366-1372, 1993
- 76 Wong PC, Hart SD, Timmermans PB. Effect of angiotensin II antagonism on canine renal sympathetic function. *Hypertension* 17: 1127-1134, 1991
- 77 Wong PC, Hart SD, Duncia JV, Timmermans P. Nonpeptid angiotensin II receptor antagonists. Studies with DuP753 and Exp 3174 in dogs. *Eur J Pharm* 202: 323-330, 1991
- 78 Yoshimura M, Nakamura S, Ito T, Nakayama M, Harada E, Mizuno Y, Sakamoto T, Yamamuro M, Saito Y, Nakao K, Yasue H, Ogawa H. Expression of aldosterone synthase gene in failing human heart: quantitative analysis using modified real-time polymerase chain reaction. *J Clin Endocrinol Metab* 87: 3936–3940, 2002
- 79 Zhuo JL, Li XC. Novel roles of intracrine angiotensin II and signalling mechanisms in kidney cells. *J Renin, Angiotensin and Aldosterone Syst* 8: 23-33, 2007

7. Danksagung

Ich danke zu allererst meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. med. Ulrich Wenzel, für die umfangreiche Unterstützung und Begleitung dieser wissenschaftlichen Arbeit. Dabei möchte ich die stets kompetente und interessierte wissenschaftliche Betreuung, von den Anfängen der Blutdruckmessung bis zur Ausarbeitung der Ergebnisse und Vorstellung der Ergebnisse auf dem Symposium „Junge Niere“ in Berlin hervorheben. Ich fand immer ein offenes Ohr bei jedem noch so marginalen Problem. Sein unermüdlicher Einsatz zu jeder Tages- und nahezu jeder Nachtzeit und die konstruktiven Diskussionen in den Besprechungen verdanke ich nicht nur diese Dissertation, sondern auch eine ganz persönliche Weiterentwicklung. So öffnete sich für mich die vorher unbekannte Tür zur Forschung, in der ich mich durch Anleitung und Ermutigung zunehmend freier und selbstständiger bewegen konnte.

Herrn Prof. Dr. med. R.A.K. Stahl danke ich für die Unterstützung bei der Durchführung der Arbeit in der III. Medizinischen Klinik am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf. Ebenfalls danke ich Herrn Dr. med. Christian Krebs aus selbiger Abteilung für die Unterstützung in der Durchführung der Operationen zur Clip Anlage und Organentfernung.

Des Weiteren danke ich den Mitarbeitern des Nephrologischen Labors Frau Saskia Schröder und Mariola Rezska, sowie Herrn Stefan Gatzemeier, für die Unterstützung in der Durchführung der Experimente.

Der Arbeitsgruppe um Herrn Prof. Dr. A.H.J. Danser, Abteilung für Pharmakologie der Erasmus Universität Rotterdam, Holland, danke ich für die Messung von (Pro)Renin und Renin.

Abschließend danke ich meiner Familie und Katrin Schlesinger für die stete Unterstützung, das Interesse und den Glauben an meine Fähigkeiten. Auf diesen Rückhalt konnte ich mich immer und zu jeder Zeit voll und ganz verlassen. Sowie Frau Sabine Schlesinger für die grammatikalische Korrektur dieser Arbeit.

Diese Arbeit wurde unterstützt durch die Firma Pfizer (Berlin, Deutschland)

Teile dieser Arbeit sind publiziert worden.

Krebs C, Weber M, Steinmetz O, Meyer-Schwesinger C, Stahl R, Danser AH, Garrelds I, van Goor H, Nguyen G, Müller D, Wenzel U.
Effect of (pro)renin receptor inhibition by a decoy peptide on renal damage in the clipped kidney of Goldblatt rats, *Kidney Int.* 74: 823-4, 2008

8. Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere, dass ich die Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes 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.

Unterschrift:.....

9. Lebenslauf

Mathias Weber

Wrangelstrasse 100
20253 Hamburg
Tel: 040 51905218, 0173 2454361
mweber@Schoen-kliniken.de

Persönliche Daten:

Geburtsdatum	12.12.1981
Geburtsort	Henstedt-Ulzburg
Familienstand	ledig
Staatsangehörigkeit	deutsch

Schulbildung:

1988-1992	Grundschule Alsterredder
1992-2001	Gymnasium Carl von Ossietzky: Abschluss: Allgemeinen Hochschulreife
2001-2002	Zivildienst Ambulanter Pflegedienst Gani, Hamburg
2002-2009	Studium der Humanmedizin Universität Hamburg
2005	Physikum

Famulatur:

September 2005	Thorax- und Abdominalchirurgie Malteser Krankenhaus St. Franziskus Hospital, Flensburg
Juli 2006	Notaufnahme Innere Medizin Asklepios Klinik St. Georg, Hamburg
August 2006	Praxis für spezielle Schmerztherapie E. Weber, Hamburg
August 2007	Neurologie Krankenhaus Barmherzige Brüder, Wien

Praktisches Jahr:

Februar-Juni 2008

Wahltertial: Orthopädie
Schön Klinikum Eilbek, Hamburg

Juni-September 2008

Tertial: Innere Medizin
Asklepios Klinik St. Georg, Hamburg

September 2008-Januar 2009

Tertial: Allgemeine Chirurgie
Royal Victoria Infirmary, Newcastle upon Tyne
Großbritannien

2009

Staatsexamen Humanmedizin

Dissertationsarbeit
2006-2012

Universitätsklinikum Hamburg Eppendorf, Zentrum
für Innere Medizin, Nephrologie, „Neue Strategien
zur Prophylaxe der ACE – Hemmer induzierten
Schädigung der stenosierten Niere bei
renovaskulärer Hypertonie

2010 bis heute

Schönklinik Hamburg Eilbek
Assistenzarzt
Abteilung für Orthopädie und Unfallchirurgie

Präsentationen

Weber M, Wenzel U: Hochregulation von Renin und
(Pro)Renin Rezeptor bei renovaskulärer
Hypertonie, Junge Niere, Berlin 17.5.2008

Publikationen

Krebs C, Weber M, Steinmetz O, Meyer-Schwesinger C,
Stahl R, Danser AH, Garrelds I, van Goor H, Nguyen G,
Müller D, Wenzel U: Effect of (pro)renin receptor
inhibition by a decoy peptide on renal damage in the
clipped kidney of Goldblatt rats. *Kidney Int.* 2008
74, 6, 823-4

Persönliche Interessen:

Literatur, Sport, Reisen

Hamburg