

4 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss der FTY720-vermittelten Lymphozyteninhibition auf die Schädigungs- und Matrixexpansionsphase bei akuter Anti-Thy1-Glomerulonephritis und auf die Progression bei chronischer Anti-Thy1-Glomerulosklerose untersucht. Bevor die Ergebnisse im Einzelnen besprochen und interpretiert werden, sollen zunächst die Vor- und Nachteile der verwandten Methodik diskutiert werden.

4.1 Methodenkritik

In dieser Arbeit wurden die Modelle der akuten Anti-Thy1-Glomerulonephritis und der chronischen Anti-Thy1-Glomerulosklerose verwendet, um zu untersuchen, ob sich die FTY720-vermittelte Lymphozyteninhibition vorteilhaft auf die akute Matrixexpansion und die Progression chronischer Nierenerkrankungen auswirkt. Bei beiden Modellen handelt es sich um gut etablierte und charakterisierte Tiermodelle mit großen Übereinstimmungen zu humanen Nierenerkrankungen. So zeigen sich Parallelen zwischen der akuten Anti-Thy1-Glomerulonephritis und der humanen akuten IgA-Nephropathie [35] ebenso wie zwischen der Progression der chronischen Anti-Thy1-Glomerulosklerose und dem Fortschreiten der diabetischen und hypertensiven Nephropathie.

Bei der akuten Anti-Thy1-Glomerulonephritis kommt es nach Injektion des OX7-Antikörpers zu einer kurzzeitigen, komplement- und NO-vermittelten Mesangialzelllyse [36]. Auf ähnliche Weise wird auch die Nierenschädigung bei der humanen Lupusnephritis und der akuten Tubulusnekrose durch zytotoxische Mengen von NO verursacht [37]. Dieser so genannten Schädigungsphase folgt eine Phase der Mesangialzellproliferation und Matrixakkumulation im Glomerulum. Das histologische Pendant sind die humane mesangioproliferative Glomerulonephritis und die IgA-Nephropathie. Die molekularen Mechanismen der Matrixvermehrung bei akuter Anti-Thy1-Glomerulonephritis mit führender TGF- β -Überexpression zeigen Parallelen zur Matrixexpansion bei diabetischer und hypertensiver Nierenfibrose [38].

Im Verlauf der akuten Anti-Thy1-Glomerulonephritis kommt es in einem zeitlichen Rahmen von 8 bis 16 Wochen zu einer vollständigen Ausheilung der glomerulären Schäden im Sinne einer restitutio ad integrum [38]. Aufgrund dieser Tatsache stellt sich die Frage, ob dieses Modell einer vollständig reversiblen renalen Matrixvermehrung hinreichend repräsentativ für chronisch-progressive Nierenerkrankungen sein kann. Dafür spricht, dass sich die molekularen

Mechanismen der Matrixvermehrung wie TGF- β -Überexpression, vermehrte Matrixsynthese und verminderte Matrixdegradation im Tiermodell und bei humanen chronisch-progressiven Nierenerkrankungen gleichen. Des Weiteren wirken sich beim Menschen etablierte antifibrotische Therapiestrategien, wie die Eiweißrestriktion [39] und die Angiotensin-II-Blockade [8] auch protektiv auf die Matrixexpansion bei akuter Anti-Thy1-Glomerulonephritis aus.

Aufgrund dieser möglichen Einschränkung des akuten Anti-Thy1-Modells wurde in dieser Arbeit auch der Einfluss von FTY720 im Modell der chronischen Anti-Thy1-Glomerulosklerose untersucht. Bei diesem Tiermodell wird die chronisch-progressive Nierenerkrankung durch die Injektion des Anti-Thy1-Antikörpers MoAb 1-22-3 in uninephrektomierte Ratten erzeugt. Nach der Antikörperinjektion kommt es zu einer kurzzeitigen, komplement- und NO-vermittelten akuten Glomerulonephritis [24, 40]. Im Gegensatz zum akuten Modell schreitet die Erkrankung über Monate selbständig in Richtung Glomerulosklerose, tubulointerstitielle Fibrose und Niereninsuffizienz fort. Ein Großteil der Tiere verstirbt ab ca. Woche 20 an den Folgen einer Urämie. Trotz eines kurzzeitigen immunologischen Schadens bei Induktion der Erkrankung, erfolgt die Progression in diesem Modell primär nicht immun-vermittelt, sondern steht im Zusammenhang mit den intrarenalen Veränderungen der Hämodynamik infolge der Uninephrektomie. Interessant an diesem Modell ist insbesondere die Eigenständigkeit der Progression, ohne dass weitere Schädigungsreize von außen hinzukommen müssen.

Wie alle Tiermodelle, so können auch die akute Anti-Thy1-Glomerulonephritis und die chronische Anti-Thy1-Glomerulosklerose nur Hinweise auf die mögliche Pathogenese und neue Therapieoptionen von humanen Nierenerkrankungen geben. Ihre tatsächliche Übertragbarkeit auf den Menschen muss jedoch im Einzelfall zusätzlich geprüft werden. Sinn und Zweck des Tierversuches liegen vielmehr darin, präklinische Vorarbeiten zu leisten.

Eine wichtige ethische Frage beim Einsatz von Versuchstieren ist, ob die Ergebnisse nicht auch durch die Verwendung von in vitro Zellkulturmodellen hätten erreicht werden können. Die folgenden Fakten ließen jedoch in vitro Experimente für die gestellten Fragen ungünstig erscheinen:

1. Die Entstehung und Progression von chronischen Nierenerkrankungen in Richtung Fibrose sind komplexe Vorgänge, an denen eine Vielzahl verschiedener renaler Zellen (Podozyten, Mesangialzellen, Fibroblasten, Tubulusepithelien, Endothelzellen), extrarenaler Zellen (Lymphozyten, Makrophagen, Thrombozyten) und systemischer Faktoren (Antikörper, Hämodynamik) beteiligt sind. Diese Komplexität kann in in vitro Studien nicht hinreichend nachgestaltet werden.

2. Neue Behandlungsansätze für humane Erkrankungen sollten zunächst im Tierversuch hinsichtlich Wirksamkeit, Sicherheit und Verträglichkeit überprüft werden. Die Hinweise, welche vorteilhaften Auswirkungen beispielsweise ACE-Hemmung und AT1-Rezeptor-Blockade auf akute und chronische Nierenerkrankungen haben, kamen aus überzeugenden Tierexperimenten [41].
3. Der in dieser Arbeit gewählte Lymphozytenmodulator FTY720 kann seine Wirkung nur in vivo, im ganzen Organismus entfalten, da vor der Bindung an Sphingosin-1-Phosphat-Rezeptoren eine Phosphorylierung in die biologisch aktive Form erfolgen muss [42, 43]. Hierzu sind nicht alle Zelltypen in der Lage.

Ziel dieser Dissertation war die Untersuchung der Hypothese, dass Lymphozyten eine aktive, profibrotische Rolle bei der akuten Matrixexpansion und Progression chronischer Nierenerkrankungen spielen. Für diese Untersuchungen ist das Tandem-Modell der akuten Anti-Thy1-Glomerulonephritis und der chronisch-fortschreitenden Anti-Thy1-Glomerulosklerose der Ratte gut geeignet.

4.2 Fibroseparameter

Als zentraler Parameter der Fibroseaktivität wurde in dieser Arbeit die Expression von Transforming Growth Factor- β untersucht. Diese Schlüsselrolle von TGF- β ergibt sich aus Arbeiten von W. Border und N. Noble, die zeigen konnten, dass die Überexpression von TGF- β im Vordergrund der renalen Gewebsfibrosierung steht [4] und dass Anti-TGF- β -Strategien wie neutralisierende Antikörper zu einer deutlichen Reduktion der Fibrose bei der Anti-Thy1-Glomerulonephritis führen [44].

Als weiterer Parameter wurde Fibronectin gewählt, ein Bestandteil extrazellulärer Matrix [45]. Plasminogen Aktivator Inhibitor-1 (PAI-1) gilt als Marker für den Matrixproteinabbau. Aufgrund seiner proteolytischen Eigenschaften ist PAI-1 sowohl an der Umwandlung von Plasminogen zu Plasmin als auch am Abbau extrazellulärer Matrix beteiligt [46].

In der vorliegenden Arbeit konnte die zentrale Rolle von TGF- β bestätigt werden. So verhielten sich die TGF- β 1-Expression und die in den histologischen Schnitten bestimmte Matrixexpansion gleichsinnig. Auch die Expression von Fibronectin und PAI-1 folgte im Wesentlichen der von TGF- β 1, so dass sich anhand der vorliegenden Daten keine Hinweise für TGF- β -unabhängige Wege der renalen Matrixexpansion ergaben.

4.3 Wirkung der FTY720-Gabe auf die Mesangialzellschädigung bei akuter Anti-Thy1-Glomerulonephritis (Protokoll 1)

4.3.1 Wirkung von FTY720 auf Mesangialzellschädigung und Proteinurie

In diesem Versuchsprotokoll wurde untersucht, ob die FTY720-vermittelte Lymphozyteninhibition die kurzzeitige, NO-vermittelte Mesangialzellschädigung der Anti-Thy1-Glomerulonephritis verstärkt oder abschwächt.

Wie im Ergebnisteil unter 3.1.8 dargestellt, führte die Gabe von FTY720 vor und während der Induktion der Glomerulonephritis zu einer signifikanten Reduktion der Leukozytenzahl und Lymphozytenzahl im peripheren Blut. Diese hatte jedoch keinerlei Veränderungen von Parametern der Mesangialzelllyse zur Folge. Dazu passen auch die Daten der glomerulären NO-Produktion. Sowohl die basale als auch die LPS-stimulierte glomeruläre NO-Produktion war bei allen kranken Tieren unabhängig von der FTY720-Gabe erhöht.

Überraschend waren die Ergebnisse der Proteinuriemessung in diesem Protokoll. So wurde unter FTY720-Gabe eine signifikante Reduktion der Proteinausscheidung im 24-Stunden Sammelurin beobachtet. Damit lassen die Daten zur glomerulären Mesangialzelllyse und NO-Produktion zwar darauf schließen, dass Lymphozyten keinen bedeutsamen Anteil an der Mesangialzellschädigungsphase der akuten Anti-Thy1-Glomerulonephritis haben und diese wie bereits zuvor beschrieben überwiegend NO- und komplementvermittelt wird [36]. Doch kann man aufgrund der FTY720-bedingten Reduktion der Proteinurie vermuten, dass diese unabhängig von einer Schädigung der Mesangialzellen ist und über andere Mechanismen, z.B. über eine Veränderung der glomerulären Filteigenschaften für Proteine, zumindest teilweise mit verursacht wird.

4.3.2 Wirkung von FTY720 auf Blutdruck und Herzfrequenz

Die systolischen Blutdruckwerte der Tiere unterschieden sich nicht signifikant zwischen den einzelnen Behandlungsgruppen. Interessanterweise wiesen FTY720-behandelte Tiere eine geringfügig niedrigere Herzfrequenz als unbehandelte, gesunde Tiere, jedoch minimal höhere Herzfrequenzen als die kranken Kontrolltiere auf. Dies ist insofern von klinischem Interesse, als dass bei Erstgabe von FTY720 beim Menschen und in Tiermodellen vereinzelt eine deutliche Reduktion der Herzfrequenz beschrieben wurde, welche eine medikamentöse Intervention mit β 2-Rezeptor-Agonisten oder Atropin erforderlich machte [24]. Dass dieser Effekt bei den Versuchen zu Protokoll 1 nicht statistische Signifikanz erreichte, könnte an dem Zeitpunkt der

Blutdruck- und Herzfrequenzmessung liegen. Während in bisherigen Veröffentlichungen das Auftreten von Bradykardien insbesondere in den ersten 48 Stunden nach Erstgabe beschrieben wurde, erfolgte die Herzfrequenzmessung in Protokoll 1 erst 5 Tage nach Beginn der FTY720-Gabe.

Aufgrund der möglichen Antagonisierung einer FTY720-bedingten Bradykardie durch Atropin wird eine Interaktion zwischen Sphingosin-1-Phosphat-Rezeptoren und muskarinergen Rezeptoren vermutet [47]. Insbesondere Sphingosin-1-Phosphat-Rezeptoren Typ 3 (S1P₃) von Herzkammer und Vorhof werden für die Vermittlung bradykarder Rhythmusstörungen verantwortlich gemacht, da es in Tierexperimenten bei S1P₃-defizienten Mäusen im Gegensatz zu Wildtypmäusen nicht zu Bradykardien gekommen war [48].

Weitere Nebenwirkungen von FTY720 wurden bisher erst bei sehr hohen Dosen von > 5 mg/kg Körpergewicht/Tag beschrieben und betrafen Störungen des Natrium- und Wasserhaushalts [49].

4.4 Wirkung der FTY720-Gabe auf die Matrixexpansion nach Induktion akuter Anti-Thy1-Glomerulonephritis (Protokoll 2)

4.4.1 Wirkung von FTY720 auf glomeruläre Matrixakkumulation und Proteinurie

In diesem Versuchsprotokoll wurde gefragt, ob die FTY720-vermittelte Lymphozyteninhibition zu einer Abnahme der renalen Matrixexpansion führt und ob die antifibrotische Wirkung mit einer verminderten Expression des profibrotischen Zytokins TGF- β 1 einhergeht.

Die Gabe von FTY720 wurde 24 Stunden nach Induktion der Glomerulonephritis begonnen. Zu diesem Zeitpunkt war die Mesangialzellyse bereits nahezu komplett abgelaufen. Nach 6 Tagen FTY720-Gabe wurden histologische und molekulare Fibrosemarker gemessen. Wie unter 3.2.3 dargestellt, bewirkte FTY720 bei den kranken Tieren ebenso wie in Protokoll 1 eine deutliche Reduktion der Leukozyten- und Lymphozytenzahlen im peripheren Blut. Bei den FTY720-behandelten Tieren war histologisch deutlich weniger Matrix nachweisbar als in den Nieren kranker, unbehandelter Tiere. Die Abnahme des in den histologischen Schnitten messbaren Matrixgehalts ging in Protokoll 2 mit gleichsinnigen Veränderungen der TGF- β 1-Expression und diese wiederum mit kongruenten Veränderungen der Matrixsynthese (Marker: Fibronectin) und Matrixdegradation (Marker: PAI-1) einher. Abgesehen von den Ergebnissen der Messung der

PAI-1-Expression erreichten die Unterschiede zwischen kranken, unbehandelten Tieren und den FTY720-behandelten Tieren statistische Signifikanz.

Angesichts der zentralen Rolle, die TGF- β für die Matrixakkumulation spielt, ist daher zu vermuten, dass die antifibrotische Wirkung der FTY720-vermittelten Lymphozyteninhibition über eine Abnahme der TGF- β 1-Expression vermittelt wird.

Bisher war nicht bekannt, dass Lymphozyten eine wichtige Rolle bei der immunmodulierten Matrixexpansionsphase der akuten Anti-Thy1-Glomerulonephritis spielen. Dies ist überraschend, da der Einfluss einer 6-tägigen Vorbehandlung mit FTY720 auf die immunvermittelte Schädigungsphase desselben Tiermodells, wie bereits unter 4.3.1 dargestellt, deutlich geringer ausfiel.

Unterstützt werden die gefundenen Ergebnisse durch kürzlich publizierte Arbeiten von Ikezumi et al, die bei dem der OX7-induzierten akuten Anti-Thy1-Glomerulonephritis vergleichbaren Modell der akuten mAb 1-22-3-induzierten Glomerulonephritis der Ratte die Einflüsse einer Anti-CD8-, Anti-CD4- und Anti-CD5-Antikörper-Behandlung untersucht haben [50]. Auch dieses Modell ist durch eine Infiltration der Glomeruli durch Lymphozyten nach Induktion der Erkrankung gekennzeichnet. Ikezumi et al fanden heraus, dass die Gabe von Anti-CD5-Antikörpern zu einer Reduktion von Proteinurie und glomerulärer Matrixvermehrung führte. Zwar konnte gezeigt werden, dass nahezu alle die Glomeruli infiltrierenden T-Lymphozyten (CD5-positiv) zur Subpopulation der CD4-positiven Lymphozyten gehörten, dass eine Behandlung mit Anti-CD4-Antikörpern jedoch zu keiner Reduktion der Mesangialzellschädigung führte. Dieses paradoxe Ergebnis wurde von den Autoren der geringeren Effektivität der CD4-Lymphozytenreduktion durch Anti-CD4-Antikörper im Vergleich zur Gabe von Anti-CD5-Antikörpern zugeschrieben. Ein zusätzlicher Einfluss der Anti-CD5-Antikörper-Behandlung auf die CD8-positive T-Lymphozyten (zytotoxische T-Lymphozyten) wird aufgrund des fehlenden Einflusses einer alleinigen Anti-CD8-Antikörper-Behandlung auf Proteinurie und Mesangialzellschädigung allerdings nicht vermutet.

Eine generelle Aussage, dass ausschließlich CD4-positive T-Lymphozyten an der Pathogenese von akuten Glomerulonephritiden beteiligt sind, lässt sich daraus jedoch nicht ableiten. So konnten Shimamine et al am Modell der spontanen IgA-Nephropathie von ddY-Mäusen protektive Effekte insbesondere durch eine Anti-CD8-Antikörper-Behandlung nachweisen [51].

Die gefundenen Ergebnisse und vorgestellten Arbeiten lassen sich dahingehend zusammenfassen, dass Lymphozyten eine aktive, profibrotische Rolle zumindest bei einigen

akuten experimentellen Glomerulonephritiden spielen. Aufgrund dieser Tatsache kann ein Einfluss von Lymphozyten auf die Pathogenese von akuten humanen Glomerulonephritiden vermutet werden.

4.4.2 Wirkung von FTY720 auf Blutdruck und Herzfrequenz

Wie auch in Protokoll 1 unterschieden sich die systolischen Blutdruckwerte in Protokoll 2 zwischen den einzelnen Behandlungsgruppen nicht signifikant. Auch die Messwerte der Herzfrequenz waren bei den FTY720-behandelten Tieren nicht niedriger als bei den unbehandelten gesunden Kontrollen und kranken Glomerulonephritis-Tieren. Die Ursache dafür, dass bei den hier beschriebenen Versuchen keine bradykarden Herzrhythmusstörungen nachgewiesen wurden, könnte in der bereits unter 4.3.2 erläuterten Tatsache einer deutlich nach Erstgabe stattfindenden Herzfrequenzmessung liegen.

4.5 Wirkung der FTY720-Gabe auf die Progression der chronischen Anti-Thy1-Glomerulosklerose (Protokoll 3)

4.5.1 Wirkung von FTY720 auf tubulointerstitielle Matrixakkumulation und Proteinurie

In Versuchsprotokoll 3 wurde die Frage untersucht, welchen Einfluss Lymphozyten auf die Progression der chronischen Anti-Thy1-Glomerulosklerose haben. Hierfür wurden Parameter der Matrixakkumulation im Tubulointerstitium gesondert von denen im Glomerulum betrachtet. Als wesentliches Ergebnis der Versuche aus Protokoll 3 ergab sich durch die FTY720-bedingte Lymphozyteninhibition eine deutliche Reduktion der Nierenfibrose im Tubulointerstitium. Dabei ging ein auf histologischer Ebene verminderter Nachweis von Matrix auch mit einer geringeren Expression von TGF- β 1, Fibronektin und PAI-1 einher, wobei die Unterschiede der PAI-1-Expression zwischen unbehandelten, kranken Tieren und FTY720-behandelten Tieren moderater ausfielen und nicht statistische Signifikanz erreichten.

Es konnte zusätzlich gezeigt werden, dass FTY720 günstige Effekte auf den Verlauf der Proteinurie hatte. Dabei ist wichtig, dass sich der Grad der Proteinurie zu Behandlungsbeginn nicht zwischen den FTY720-behandelten und unbehandelten Tieren unterschied. In beiden Gruppen wurde im weiteren Verlauf ein leichter Abfall der Proteinurie bis Woche 8 nach Krankheitsinduktion beobachtet. Anschließend kam es als Zeichen der Progression der Erkrankung zu einem deutlichen und kontinuierlichen Anstieg der Proteinausscheidung in der

erkrankten, unbehandelten Gruppe. Dieser kontinuierliche Anstieg konnte durch die Lymphozyteninhibition signifikant gemindert werden.

Eine Verminderung der Proteinurie in Folge der Verminderung der renalen Matrixakkumulation ist nicht überraschend, da beide Parameter eng miteinander assoziiert sind, wobei in aktuellen Publikationen noch diskutiert wird, ob die Proteinurie als Ursache oder als Folge eines strukturellen Nierenschadens anzusehen ist. So wird von der Arbeitsgruppe um Guiseppe Remuzzi die Proteinurie nicht nur als Folgeerscheinung einer glomerulären Schädigung gesehen, sondern selbst direkt auch für interstitielle Inflammation und Parenchymläsionen verantwortlich gemacht. Versuche an Modellen zur 5/6 Nephrektomie und passiven Heymann-Nephritis konnten hierbei zeigen, dass die inflammatorische Reaktion im Interstitium um so stärker ist, je stärker auch die Proteinüberladung der angrenzenden Tubuli ist. Dies sei unabhängig vom Grad der Schädigung angrenzender Glomerula [52]. Diese Auffassung wird nicht von allen Autoren geteilt, insbesondere fehlen hier Untersuchungen und Interventionsstudien zum kausalen Zusammenhang.

4.5.2 Wirkung von FTY720 auf glomeruläre Matrixakkumulation

Auch auf glomerulärer Ebene bewirkte die FTY720-vermittelte Lymphozyteninhibition eine Verminderung von TGF- β -Überexpression und Matrixakkumulation, jedoch waren die Unterschiede zu den unbehandelten, kranken Kontrolltieren moderater und erreichten nicht statistische Signifikanz.

Dieses Ergebnis lässt sich bei erster Betrachtung dahingehend interpretieren: Der Einfluss von Lymphozyten auf die Fibrosierung der Glomeruli ist weniger bedeutend als auf die tubulointerstitielle Nierenfibrose. Doch scheinen viel eher das Design und der Zeitablauf der Versuche in Protokoll 3 dafür verantwortlich zu sein. So ist zu berücksichtigen, dass die FTY720-Gabe erst 7 Tage nach Induktion der Erkrankung durch den Anti-Thy1-Antikörper begonnen wurde. Zu diesem Zeitpunkt sind glomeruläre Schädigungsphase und Matrixexpansionsphase im Glomerulum nahezu vollständig abgelaufen, was die gewünschte Untersuchung der langen Phase der Krankheitsprogression ermöglicht. Auch die Ergebnisse aus Protokoll 2 - hier konnten glomeruläre Matrixexpansion und TGF- β -Überexpression durch eine innerhalb von 24 Stunden nach Anti-Thy1-Antikörpergabe begonnene Gabe von FTY720 vermindert werden - lassen vermuten, dass der Zeitpunkt des Beginns der FTY720-Therapie entscheidend für die Ausprägung des glomerulären Schadens ist.

4.5.3 Wirkung von FTY720 auf die Nierenfunktion

Die Ergebnisse aus dem Versuchsprotokoll 3 zeigen zusätzlich, dass die Lymphozyteninhibition nicht nur die Progression der Anti-Thy1-Glomerulosklerose auf histologischer und molekularer Ebene vermindert, sondern auch mit einer verbesserten Nierenfunktion einhergeht. So geht die Erkrankung selbst mit einem Anstieg der Retentionsparameter Serum-Kreatinin und Serum-Harnstoff einher. Als Ausdruck der gestörten Erythropoetin-produzierenden, endokrinen Funktion der betroffenen Nieren kommt es bei den unbehandelten Tieren zu einem Abfall der Erythrozytenzahl im peripheren Blut. Die FTY720-vermittelte Lymphozyteninhibition hatte hier deutlich günstige Auswirkungen auf relevante Endpunkte wie Serum-Kreatinin und Serum-Harnstoff. Etwas moderater wurde auch der Grad der renalen Erythrozytenzahlminderung im peripheren Blut verringert.

4.5.4 Wirkung von FTY720 auf Lymphozyten

Die Gabe von FTY720 führte zu einer Reduktion der Leukozytenzahlen im peripheren Blut. Dieser Abfall der Leukozytenzahlen war maßgeblich durch einen deutlichen Abfall der Lymphozytenzahl im peripheren Blut bestimmt. Wie beabsichtigt, führte die Reduktion der Lymphozytenzahl im Blut zu einer nachfolgenden Reduktion der Lymphozytenzahl im Nierengewebe. Dabei waren die Auswirkungen von FTY720 auf CD8-positive Zellen etwas stärker als auf CD4-positive Zellen, jedoch mit einem ähnlichen Verteilungsmuster in den Glomerula wie im tubulointerstitiellen Kompartiment.

Als Indikator für die selektive Wirkung von FTY720 veränderte sich die Zahl der infiltrierenden Makrophagen (ED1-positive Zellen) nur gering und nicht signifikant.

Die gefundenen Ergebnisse werden durch kürzlich veröffentlichte Daten von Ikezumi et al unterstützt [53], welche im Anschluss an die vorliegende Arbeit bei einem ähnlichen Modell einer chronisch-progressiven Glomerulonephritis durch gezielte Intervention mittels Anti-CD5-, Anti-CD4- und Anti-CD8-Antikörper die Progression der Erkrankung günstig beeinflussen konnten. Durch die differenzierte Beobachtung der T-Zell-Subpopulationen wird von Ikezumi eine herausragende Rolle der CD4-Lymphozyten vermutet, da diese für die Aktivierung und Rekrutierung von CD8-Lymphozyten verantwortlich sind.

4.6 Lymphozyten und renale Matrixakkumulation

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass Lymphozyten eine pathophysiologisch wichtige Rolle bei der Matrixexpansion der akuten Anti-Thy1-Glomerulonephritis und bei der Progression der chronischen Anti-Thy1-Glomerulosklerose von einer initial glomerulären Erkrankung hin zu tubulointerstitieller Fibrose und Niereninsuffizienz spielen. Das bereits bekannte günstige Wirkspektrum von FTY720 bei Organtransplantation, Autoimmun- und Malignomkrankungen [24, 25] wird durch die hier dargestellten Ergebnisse erweitert.

In bisherigen Arbeiten konnte FTY720 nicht nur in Transplantationsmodellen der Haut-, Herz-, Dünndarm-, Inselzell-, Leber- und Nierentransplantation bei verschiedenen Tierarten allein oder in Kombination mit Ciclosporin günstige Effekte aufweisen [25], sondern auch akute Transplantatrejektionen bei nierentransplantierten Patienten verhindern, welche eine zusätzliche Immunsuppression mit Ciclosporin und Kortikosteroiden erhielten [47]. Auch bei einer Vielzahl von Modellen autoimmuner Erkrankungen wie der experimentellen Kollagen-induzierten Arthritis [54], der Autoimmunmyokarditis [55], der Autoimmunuveoretinitis [56], sowie des systemischen Lupus erythematodes [57], des Autoimmundiabetes [58], der Autoimmunthyreoiditis [59] und der Autoimmunenzephalitis [60] verzeichnete FTY720 positive Effekte.

Die in dieser Arbeit gefundenen Daten sind deshalb von großem Interesse, weil sie als erste Interventionsstudie eine aktive Beteiligung von Lymphozyten bei der akuten Matrixexpansion und Progression von Anti-Thy1-induzierten Nierenerkrankungen nachweisen.

Während für die pathophysiologischen Vorgänge bei Transplantationen und Autoimmunerkrankungen die bedeutende Rolle einer antigenspezifischen Immunantwort durch Lymphozyten allgemein akzeptiert wird, ist es zur Zeit noch unklar, wie Lymphozyten als Repräsentanten des spezifischen Immunsystems die eher unspezifischen Entzündungsvorgänge bei akuter Matrixexpansion und chronischer Progression in Richtung Nierenfibrose und Niereninsuffizienz beeinflussen.

So wird vermutet, dass Lymphozyten auch bei nicht immunologisch bedingten Erkrankungen mit derzeit noch nicht näher bekannten Autoantigenen interagieren. An Tiermodellen zu kardialer Ischämie konnte z. B. die Arbeitsgruppe um D.G. Ohad kürzlich zeigen, dass es nach einem Myokardinfarkt zum Auftreten von autoreaktiven, zytotoxischen T-Zellen kommt, welche sich überraschenderweise gegen intakte Myozyten richten und damit zu Aggravation und

Progression der Myokardischämie in Richtung Herzinsuffizienz führen [61]. Eine solche Autoreaktivität könnte es demzufolge auch bei anderen Organsystemen wie der Niere geben.

Eine weitere Erklärung kann in den engen funktionellen Interaktionen zwischen Makrophagen und Lymphozyten liegen [62]. Wie bereits beschrieben, ließen sich in dieser Arbeit keine signifikanten Einflüsse von FTY720 auf Makrophagen nachweisen. Lediglich im Tubulointerstitium kam es bei den Versuchen von Protokoll 3 zu einer geringen, nicht signifikanten Verminderung von ED1-positiven Zellen. Ob dieser Effekt wirklich zufällig ist oder der in dieser Arbeit gewählte Versuchsaufbau für die Fragestellung ungeeignet ist, muss in der Zukunft geklärt werden. Denkbar wäre auch, dass Lymphozyten weniger zu einer reinen Zunahme der absoluten Makrophagenzahl im Tubulointerstitium, sondern eher zu einer Selektion besonders reagibler Makrophagen führen.

Zusätzlich muss bedacht werden, dass Lymphozyten in der Lage sind, auch direkt profibrotische Zytokine zu sezernieren, die dann selbst und unmittelbar den renalen Matrixakkumulationsprozess verstärken. Insbesondere konnten in Lymphozyten die beiden wichtigen Fibrosemediatoren TGF- β und Angiotensin-II nachgewiesen werden [63].

4.7 FTY720 im Vergleich zu Mycophenolat-Mofetil (MMF)

Die gefundenen Ergebnisse lassen sich mit bisherigen Publikationen, welche eine Verbesserung akuter und chronischer Nierenerkrankungen durch eher unspezifische Immunsuppression wie beispielsweise Bestrahlung mit Röntgenstrahlung oder die Gabe von Kortikosteroiden [10] postulieren, gut vereinbaren. Besonders hervorzuheben sind neuere Studien, die zeigen konnten, dass die Gabe von Mycophenolat-Mofetil (MMF) am Tiermodell der 5/6-Nephrektomie eine signifikante Reduktion von Proteinurie, sowie glomerulärer und tubulointerstitieller Fibrose bewirkt [64-66].

Bei MMF handelt es sich um ein relativ nebenwirkungsarmes, in der Transplantationsmedizin etabliertes Immunsuppressivum, welches über eine Hemmung der Inosin-Monophosphat-Dehydrogenase (IMPDH) die Purinsynthese von Lymphozyten inhibiert. Die Selektivität von MMF für Lymphozyten ist allerdings nicht mit der von FTY720 vergleichbar, da es zusätzlich zu einer Depletion des Monozyten-Makrophagen-Systems kommt [67].

Am Tiermodell der chronischen Anti-Thy1-Glomerulosklerose konnten H. Peters et al. kürzlich für MMF eine Verlangsamung der Progression der Erkrankung nachweisen [68]. Im Vergleich

zur Medikation mit Enalapril in maximal wirksamer Dosierung erreichte MMF ähnlich positive Effekte auf Proteinurie, Blutdruck, tubulointerstitielle und glomeruläre Matrixakkumulation, TGF- β 1-, Fibronektin- und PAI-1-Expression, Serum-Kreatinin und Serum-Harnstoff sowie auf die glomeruläre Filtrationsrate. Dies ist insofern überraschend, da sich der Wirkmechanismus beider Medikamente nach bisherigem Wissen deutlich voneinander unterscheidet. So würde man erwarten, dass die antiinflammatorische Wirkung von MMF auf die Reduktion der renalen Lymphozyten- und Makrophageninfiltration der von Enalapril überlegen ist und dass umgekehrt die Wirkung von Enalapril auf die Reduktion der renalen Matrixakkumulation der von MMF überlegen ist. Die Versuche zeigten jedoch eine vergleichbare Verminderung von tubulointerstitieller Inflammation und tubulointerstitieller Fibrose für beide Medikamente. Da außerdem keine additiven Effekte bei der Kombination von MMF und maximaler ACE-Hemmung erzielt wurden, liegt die Vermutung nahe, dass MMF und Enalapril über eine gemeinsame pathophysiologische Endstrecke ihre antifibrotische Wirkung entfalten.

Für diese Verbindungspunkte von inflammatorischen und profibrotischen Mechanismen sprechen auch eine Reihe von (überwiegend in vitro) Studien anderer Arbeitsgruppen. Auf extrazellulärer Ebene konnte für die proinflammatorischen Zytokine Interleukin-1 (IL-1) und Tumor-Nekrose-Faktor- α (TNF- α) eine direkte Stimulation von TGF- β - und Matrixproteinexpression, sowie eine Differenzierung von Fibroblasten nachgewiesen werden [69-71]. Umgekehrt wurde für profibrotische Zytokine wie Angiotensin-II eine direkte Induktion proinflammatorischer Zytokine wie Nuclear Factor Kappa B (NF κ B) und auch eine indirekte Verstärkung der Makrophageninfiltration über das Chemokin RANTES gezeigt [10, 72, 73].

Des Weiteren konnten für MMF auch direkt antiproliferative Effekte in vitro und in vivo auf glatte Gefäßmuskelzellen, Mesangialzellen und renale Fibroblasten ebenso wie eine Hemmung der Sekretion profibrotischer Zytokine wie Platelet-derived growth factor (PDGF) und TGF- β durch Makrophagen und Lymphozyten nachgewiesen werden [10].

Im Gegensatz zu MMF beeinflusst FTY720 in den in dieser Arbeit gewählten Konzentrationen (0,3 mg/kg Körpergewicht/Tag) sehr selektiv die Lymphozyten und hat keine Effekte auf die Proliferation von renalen Zellen. Daher lassen sich die gefundenen Ergebnisse als spezifische Effekte der Lymphozyten auf die akute und chronische Anti-Thy1-induzierte Matrixexpansion interpretieren.

4.8 Lymphozyten und Progression chronischer Erkrankungen – ein Ausblick

Wie die Anti-Thy1-induzierte, chronische Glomerulosklerose ist eine Vielzahl von experimentellen und humanen Nierenerkrankungen gleichermaßen durch eine glomeruläre und tubulointerstitielle Infiltration mit Lymphozyten gekennzeichnet. Diese wird nicht nur bei immunvermittelten, sondern auch bei primär nicht-immunvermittelten Erkrankungen beobachtet [3, 10, 74-76]. Ein uniformes Merkmal primär nicht-immunvermittelter Nierenerkrankungen wie der diabetischen und hypertensiven Nephropathie ist zudem das Auftreten von (Mikro-) Albuminurie und Proteinurie.

Wie bereits unter 3.5.1 beschrieben, wird von der Arbeitsgruppe um Remuzzi insbesondere das Auftreten einer Proteinurie bei verschiedenen Nierenerkrankungen als Ursache interstitieller Inflammation und Parenchymläsionen gesehen. Die inflammatorische Reaktion wird hierbei durch eine Vielzahl möglicher Mechanismen erklärt. So sollen sich glomerulär filtrierte Proteine im Zytoplasma von proximalen Tubuluszellen anreichern und dort zu einer Zerstörung der Basalmembran führen. Diese führt dann über eine Freisetzung des Zellinhaltes in das Interstitium zu einer reaktiven Inflammation mit Lymphozyteninfiltration [76]. Auch eine Veränderung des Phänotyps von Tubuluszellen und die Sekretion von Zytokinen wie Monocyte Chemoattractant Protein-1 (MCP-1), Endothelin-1 und RANTES als Folge einer Proteinüberladung werden als Ursache einer Migration von Lymphozyten und Makrophagen in das Tubulointerstitium diskutiert [77-80].

Bei diesen renalen Erkrankungen könnte somit eine lymphozytenmodulierende Intervention mit FTY720 als therapeutische Option die etablierten Therapiemöglichkeiten von ACE-Hemmung und Angiotensin-II Rezeptor-Blockade ergänzen.

Neben chronischen Nierenerkrankungen weisen aber auch viele chronische Erkrankungen anderer Organsysteme wie dem Herz-Kreislaufsystem, der Lunge und der Leber häufig einen bisher als unspezifische Gewebsinfiltration gedeuteten Lymphozyteneinstrom auf. So gilt die Atherosklerose als inflammatorische Erkrankung, bei der in jedem Erkrankungsstadium die Entzündungsreaktion durch Makrophagen und T-Lymphozyten aufrechterhalten wird. Dies führt über eine verstärkte Migration und Proliferation von glatten Gefäßmuskelzellen, sowie Gewebsfibrose zur so genannten komplizierten Läsion der Atherosklerose [81]. Auch für Modelle chronischer Lungenfibrose konnten Kunkel et al zeigen, dass das Zusammenwirken von Lymphozyten und Zytokinen wie Interleukin-4 (IL-4) und IL-13 zu Fibroblastenaktivierung und -proliferation sowie Kollagenablagerungen führt [82]. In einer Studie des Pitié-Salpêtrière

Hospital, Paris konnte bei 200 Patienten mit ethyltoxischer Leberzirrhose nicht nur das Vorhandensein von Lymphozyteninfiltraten nachgewiesen werden, sondern auch dass das Ausmaß des fibrotischen Leberumbaus direkt mit dem Ausmaß der Lymphozyteninfiltration korreliert [83]. Anhand der aufgeführten Beispiele ließe sich spekulieren, dass sich auch hier durch Lymphozyteninhibition mittels FTY720 günstige Effekte zur Verhinderung von Krankheitsprogression und Organversagen erreichen lassen.