

## 4 Diskussion

Die möglichen Ursachen für die hohe Inzidenz kardiovaskulärer Komplikationen bei Patienten mit cNI [1] sind vielfältig.

Die kausalen Zusammenhänge dieser „kardiorenenalen“ Verbindung sind bisher jedoch weitgehend ungeklärt.

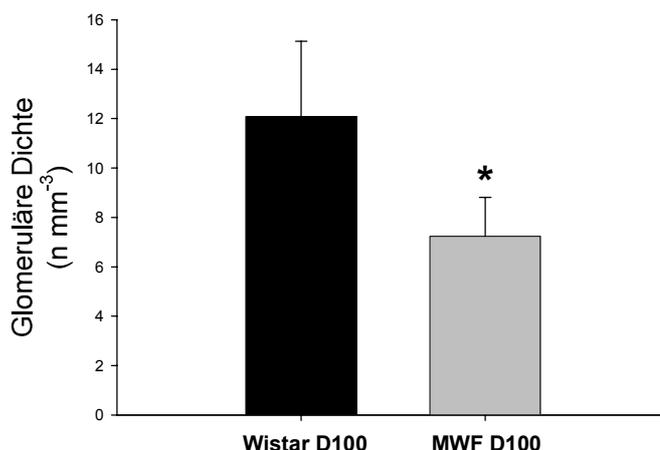
Die Relevanz der intrauterinen Programmierung der Nephronanzahl, renaler und kardiovaskulärer Erkrankungen trat in den letzten Jahren - auf der Basis der Arbeiten von Brenner und Barker - zunehmend in den Vordergrund. Eine besondere Rolle sowohl für die Progression einer cNI als auch für die Entstehung kardialer Erkrankungen spielt dabei eine verminderte Nephronanzahl.

Die vorliegende Arbeit sollte daher kardiale Veränderungen bei cNI auf ihre Abhängigkeit von einer unterschiedlich stark verminderten Nephronanzahl zu untersuchen. Es stellte sich zudem die Frage, ob sich Unterschiede im Hinblick auf die Genese des Nephrondefizites (operativ oder genetisch verminderte Nephronanzahl) darstellen.

Zu diesem Zweck wurden die Untersuchungen an einem gesunden und einem Rattenstamm mit genetisch verminderter Nephronanzahl durchgeführt. Ratten beider Stämme wurden einer 5/6-Nx unterzogen, so dass die Anzahl funktionsfähiger Nephrone weiter dezimiert wurde. Ein Teil der Tiere beider Gruppen bekam zudem postoperativ einen ACE-Hemmer verabreicht, um Auswirkungen des Medikamentes zu untersuchen, das den derzeitigen Goldstandard für Blutdrucksenkung bei gleichzeitiger Nephroprotektion darstellt.

### **4.1 Nierenfunktionseinschränkung**

Um das Ausmaß des Nephrondefizits in den verschiedenen Gruppen genau abschätzen zu können, wurde die Nephronanzahl der Tiere des jeweiligen Stammes über stereotaktische Methoden in Vorarbeiten unserer AG bestimmt. Diese unveröffentlichten Daten zeigten eine um 40% verminderte Glomeruladichte bei den unbehandelten Kontrolltieren des MWF-Stammes im Vergleich zum Wistarstamm (siehe **Abbildung 19**).



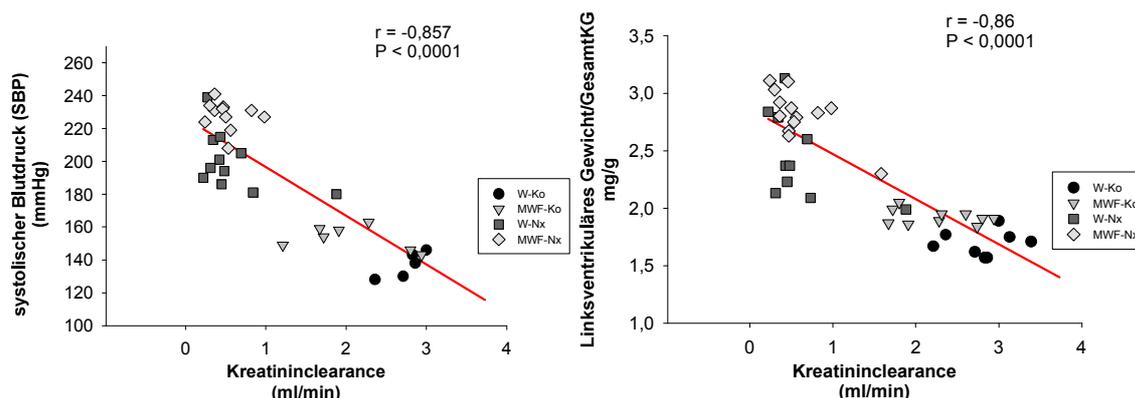
**Abbildung 19:** Glomeruläre Dichte (Anzahl pro mm<sup>3</sup>) bei Tieren des Wistar- und des MWF-Stammes an Tag 100

Gleichzeitig kam es bei den MWF-Tieren zu einem Anstieg der glomerulären Fläche von 34%. Dies bestätigt die Ergebnisse anderer Arbeiten, die eine ähnliche Reduktion der Nephronanzahl bei MWF-Tieren beobachten konnten. [71]

Aufgrund dieser Daten und der standardisierten Durchführung einer 5/6-Nx konnte von einer klar definierten Abnahme der Nephronanzahl in den Gruppen MWF-Ko, W-Nx und MWF-Nx ausgegangen werden.

Die aus dem Nephronverlust resultierende Einschränkung der Nierenfunktion wurde durch Bestimmung der Kreatininclearance bestätigt. (siehe **Abbildung 9**) Die deutliche Abnahme der Kreatininclearance belegt die ausgeprägte Abnahme der Nephronanzahl in den untersuchten Modellen und zeigt, dass sowohl eine genetisch als auch der operativ verminderte Nephronanzahl gleichermaßen eine Verschlechterung der Niereninsuffizienz induzieren können. Auf den ersten Blick mag es verblüffen, dass sich die Kreatininclearance zwischen W-Nx und MWF-Nx-Tieren nicht signifikant unterscheidet. Im Kontext der Brenner'schen Hypothese kann möglicherweise von einem stärkeren Anstieg der glomerulären Filtration (stärkere Hyperfiltration) bei den MWF-Nx Tieren im Vergleich zu den W-Nx Tieren ausgegangen werden.

In der vorliegenden Arbeit zeigte sich eine klare lineare Korrelation zwischen der Kreatininclearance und dem systolischen Blutdruck sowie der LVH.



**Abbildung 21:** Korrelationen zwischen dem systolischen Blutdruck und der Kreatinin-clearance sowie zwischen der LVH und der Kreatinin-clearance

Ähnliche Zusammenhänge wurden erst kürzlich in zwei grossen epidemiologischen Studien dargestellt. In der HOORN-Studie war die (errechnete) GFR in der Normalpopulation linear mit einem erhöhten Risiko kardiovaskulärer Mortalität assoziiert [8]. Die HOPE-Studie konnte – für ein Patientenkollektiv mit kardiovaskulärem Risikoprofil – eine ähnliche Korrelation mit dem Serumkreatininspiegel zeigen [9]. Dies bestätigt eine verminderte Nephronanzahl (und damit verminderte Nierenfunktion) als einen unabhängigen Risikofaktor für kardiovaskuläre Mortalität.

Die Gabe eines ACE-Hemmers führte in beiden 5/6-Nx-Gruppen zu einer Erhöhung der Kreatinin-clearance. Dieses Ergebnis verdeutlicht das nephroprotektive Potential des Medikamentes. Die Verbesserung der glomerulären Funktion (Nephronprotektivität) von ACE-Hemmern sind in grossen Studien beschrieben worden [80]. In zwei aktuellen Arbeiten gab es darüber hinaus Hinweise auf ein regeneratives Potential des ACE-Hemmers auf geschädigtes Nierengewebe [68] [69].

Auf der Basis dieser Ergebnisse wurden der systolische Blutdruck, das Ausmaß der kardialen Hypertrophie sowie die linksventrikuläre mRNA-Expression von ANP in Abhängigkeit von der Nephronanzahl untersucht.

#### 4.2 Der systolische Blutdruck

1988 postulierten Brenner et al. erstmals eine verminderte Anzahl funktionstüchtiger Nephrone als mögliche Ursache für die essentielle Hypertonie [18]. Ursache für eine

verminderte Nephronzahl können eine operative Reduktion der Nierenmasse, ein degenerative Glomerulosklerose sowie eine kongenitale Oligonephronie sein.

2003 wurde durch die Arbeit von Keller et al. [31] der direkte Zusammenhang zwischen kongenital verminderter Nephronanzahl und einer essentieller Hypertonie an einer kleinen Patientenstichprobe belegt. Bisher ist unklar, in welcher quantitativen Relation die zur Verfügung stehende Nephronzahl zum daraus resultierenden Anstieg des arteriellen Blutdruckes steht.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit konnten zeigen, dass eine stufenweise abnehmende Nephronanzahl (sowohl genetisch als auch durch 5/6-Nx bedingt) in den unbehandelten Gruppen mit einer stetigen Blutdruckerhöhung einhergeht (siehe **Abbildung 10**). Diese Ergebnisse stimmen mit verschiedenen Arbeiten überein, in denen ebenfalls eine Blutdruckerhöhung am Rattenmodell der 5/6-Nx [54], am Modell der gesunden MWF-Ratte [71, 73] sowie der uninephrektomierten MWF-Ratte [81] gezeigt werden konnte. Auch in der Grössenordnung des Blutdruckanstiegs sind unsere Ergebnisse mit denen der zitierten Arbeiten vergleichbar.

Die vorgelegte Arbeit ist darüber hinaus eine der wenigen, die eine direkte quantitative Abhängigkeit der Blutdruckhöhe von der Anzahl der vorhandenen funktionstüchtigen Nephrone nachweist. Vergleichbare Befunde wurden in der Arbeitsgruppe um Brenner erhoben: In einer Arbeit von Ots et al. [29] zeigte eine Gruppe 5/6-nephrektomierter Ratten, denen zusätzliches Nierengewebe transplantiert worden war, eine deutliche Senkung des zuvor erhöhten Blutdruckes. Als Ursache der Blutdrucksenkung wurde hier ebenfalls der enge Zusammenhang zwischen Nephronanzahl und Höhe des Blutdrucks diskutiert.

Die Gabe von Ramipril war sowohl bei W-Nx als auch bei MWF-Nx in der Lage, den Blutdruck auf das stammspezifische Ausgangsniveau zu senken. Dies bestätigt die Ergebnisse anderer Arbeiten, in denen ebenfalls eine Senkung des Blutdruckes mittels Gabe eines ACE-Hemmers (Enalapril, Captopril) für 5/6-Nx-Ratten [63] [82] und für uninephrektomierte MWF-Ratten [81] gezeigt werden konnte. Dies ist von Interesse, da das operative Modell der 5/6-Nx ein klassisches Niedrig-Renin-Hochdruck-Modell darstellt [63]. Auch der genetische Nephronmangel der MWF-Tiere geht mit einem salzsensitiven Niedrig-Renin-Bluthochdruck einher (unpublizierte Daten der AG Kreuzt). Die gute Senkbarkeit des arteriellen Blutdrucks

mittels ACE-Hemmer in beiden Modellen spricht daher trotz niedriger Reninspiegel für eine Rolle des (lokalen) RAS in der Entstehung des Bluthochdruckes.

Zusammengefaßt bestätigen diese Ergebnisse den von Brenner beschriebenen Zusammenhang zwischen Nephronanzahl und erhöhtem Blutdruck. Darüber hinaus zeigt diese Arbeit eine erstmals eine direkte quantitative Abhängigkeit zwischen der Nephronanzahl und der Höhe des Blutdrucks. Dies gilt sowohl für eine operative Reduktion der Nierenmasse als auch für das kongenitale Nephrondefizit.

#### **4.3 Herzhypertrophie**

Die linksventrikuläre Hypertrophie (LVH) ist die häufigste und früheste kardiale Komplikation einer progredienten cNI [10]). Darüber hinaus ist die LVH beim Menschen mit dem Schweregrad der präterminalen cNI assoziiert.[83] [10] und konnte als ein unabhängiger Prognosefaktor für die kardiovaskuläre Mortalität bei cNI identifiziert werden. [9] Unklar ist, ob auch ein quantitativer Zusammenhang zwischen dem Ausmaß der LVH und der funktionstüchtigen Nephronanzahl existiert.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit konnten zeigen, dass sich bei stufenweise abnehmender Nephronanzahl in den unbehandelten Gruppen (W-Ko, MWF-KO, W-Nx, MWF-Nx) sowohl im genetischen als auch 5/6-Nx-Modell eine LVH entwickelt. Dabei stellte sich die Ausprägung der LVH umso stärker dar, je weniger funktionsfähige Nephrone vorhanden waren. (siehe **Abbildung 11**) Dieser von uns erstmals gezeigte quantitative Zusammenhang zwischen Nephronanzahl und LVH stellt sich analog zu unseren Ergebnissen zum systolischen Blutdruck dar.

Die Erkenntnisse bestätigen Befunde mehrerer Arbeitsgruppen, nach denen die Entwicklung einer LVH am Modell der 5/6-Nx und für die MWF-Ratte gezeigt werden konnte [54] [84].

Unklar bleibt, ob die Entstehung einer LVH bei cNI auch durch blutdruckunabhängige Faktoren erfolgt: dies ist in experimentellen Arbeiten beschrieben, in der urämiespezifische Faktoren für die Entwicklung einer LVH verantwortlich sind [45] [84].

Zu diesen Faktoren gehört die Volumenbelastung durch eine Anämie [12], eine Verkalkung des Klappenapparates und der Koronarien und ein Hyperparathyreoidismus als fibroseinduzierender Wachstumsfaktor [14]

Unveröffentlichte Daten unserer Arbeitsgruppe konnten zeigen, dass die cNI in dem untersuchten Tiermodell der 5/6-Nx zu keiner relevanten renalen Anämie bei Ratten führt. Eine Rücksprache mit der AG Eckart in Nürnberg/Erlangen bestätigt diesen Befund. Sie wurde daher in unseren Untersuchungen nicht berücksichtigt. Andere genannte Faktoren waren nicht Teil des Versuchsaufbaus dieser Arbeit und wurden daher nicht direkt (auf ihre spezifische Wirkung) untersucht. Sie werden Inhalt weiterer experimenteller Untersuchungen der Arbeitsgruppe sein.

Die Gabe von Ramipril konnte die Entwicklung einer LVH über das stammspezifische Niveau hinaus verhindern. Die Regression der LVH durch Ramipril erfolgte trotz der Tatsache, dass die untersuchten Tieren beider Stämme nachweislich Niedrigreninmodelle sind. Daher ist zu vermuten, dass der Effekt von Ramipril auch durch direkte antiproliferative Einflüsse auf lokales Aldosteron und ATII im Myokard zustande kommt. Remuzzi et al. konnten darüber hinaus eine partielle Regression einer glomerulären Sklerose unter ACE-Hemmung durch Lisinopril an MWF-Ratten beobachten [68].

Solche über die reine Blutdrucksenkung hinausgehende Effekte von Ramipril auf die Regression der LVH konnten ausserdem am experimentellen Modell [84] sowie an Patienten mit cNI [85] [67] [86] und in der HOPE-Studie [87] gezeigt werden.

Sie sind Hinweis dafür, dass die LVH bei cNI die partiell unabhängig von der Blutdruckerhöhung entsteht.

Die RVH wurde als Marker für eine erhöhte Vorlast und damit eine vermehrte Volumenbelastung der Tiere untersucht.

Sie entwickelte sich bei den Tieren mit dem grössten Nephrondefizit (MWF-Nx), nicht jedoch in den anderen Gruppen (W-Ko, MWF-Ko, W-Nx, siehe **Abbildung 12**). Dies kann als eine zusätzliche Volumenbelastung mit beginnender kardialer Dekompensation in dieser Gruppe interpretiert werden.

Im Gegensatz zu der LVH war die RVH bei MWF-Nx durch Gabe von Ramipril nicht reversibel. Daraus folgt, dass eine druckbelastungsinduzierte LVH mittels ACE-Hemmer verhindert werden kann. Die volumenbelastungsinduzierte RVH ist dagegen auch bei gleichzeitiger Senkung des systolischen Blutdrucks nicht durch ACE-Hemmer korrigierbar. Falls der ACE-Hemmer einer Hypertrophie über direkte antiproliferative Effekte entgegenwirkt, so wirkt dies scheinbar nur auf den linken Ventrikel.

Diese Befunde lassen die Existenz einer funktionell kritischen Grenze der Nephronanzahl vermuten: wird diese unterschritten, so kommt es zur Manifestation einer RVH.

Zusammenfassend konnte diese Arbeit erstmals einen quantitativen Zusammenhang zwischen der Anzahl funktionsfähiger Nephrone und dem Ausmaß der LVH zeigen. Die Gabe eines ACE-Hemmers konnte zudem das Ausmaß der LVH auf stammspezifischem Ausgangsniveau stabil halten. Eine RVH als Indikator für eine Volumenbelastung trat erst bei stark verringerter Nephronanzahl auf und war im Gegensatz zu der LVH nicht durch ACE-Hemmer Gabe zu korrigieren.

#### **4.4 Linksventrikuläre mRNA-Expression von ANP**

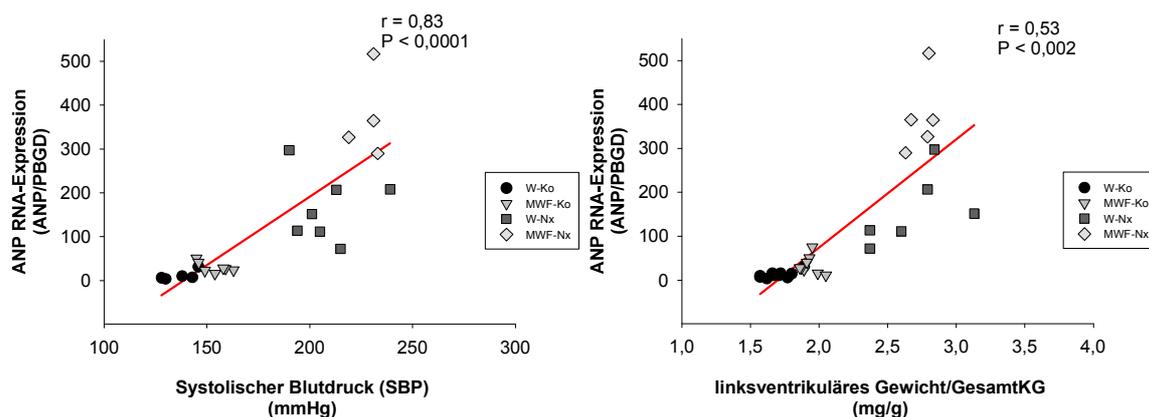
ANP vermittelt als ein wichtiges Effektorpeptid verschiedene Wirkungen bei gestörter kardialer Funktion. Atrial produziertes ANP fördert als Reaktion auf Dehnung der Atria über verschiedene Mechanismen die Natriumausscheidung und hat damit die Funktion eines „endogenen Saluretikums“.

Die linksventrikuläre mRNA-Expression von ANP dagegen ist Teil des fetalen genetischen Programmes, dass das Herzwachstum stimuliert. Im adulten Organismus kann dieses Programm bei pathologischer kardialer Hypertrophie reaktiviert werden: die mRNA-Expression korreliert daher gut mit der Entwicklung einer LVH [49]. Da die mRNA-Expression im Patienten nicht bestimmt werden kann, wird die ANP-Plasmakonzentration als Surrogatparameter für eine linksventrikuläre Funktionseinschränkung verwendet [50].

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigten einen Anstieg der mRNA-Expression von ANP mit zunehmendem Nephronverlust (MWF-Ko, W-Nx, MWF-Nx, siehe **Abbildung 13**). Dies bestätigt die Ergebnisse zahlreicher Arbeiten, die ebenfalls einen Anstieg der ANP-Expression für die experimentelle Herzhypertrophie [54] [88-90] und Herzinsuffizienz bei cNI beschreiben konnten. Für den Menschen konnte eine Erhöhung der Serumkonzentration natriuretischer Peptide bei LVH gezeigt werden. [50]. Darüber hinaus kann die vorgelegte Arbeit erstmals einen quantitativen Zusammenhang zwischen steigender linksventrikulärer ANP-Expression und dem Ausmaß des Nephronverlustes belegen. Unterstrichen wird dieser Zusammenhang durch die Korrelation von ANP mit der Kreatininclearance, die unsere Ergebnisse ebenfalls erstmals zeigen konnten.

Dabei fand sich in der Gruppe MWF-Nx die mit Abstand stärkste Erhöhung der mRNA-Expression von ANP und des Plasmakreatinins. Dies kann als Zeichen einer ausgeprägten LVH bei massivem Nephronmangel in dieser Gruppe interpretiert werden.

Die mRNA-Expression von ANP korrelierte zudem linear mit der Höhe des systolischen Blutdrucks und dem Ausmaß der LVH.



**Abbildung 22:** Korrelation der linksventrikulären mRNA-Expression von ANP mit dem systolischen Blutdruck sowie mit der LVH

Diese Zusammenhänge festigen zum einen den engen Zusammenhang zwischen einer verminderten Nephronanzahl und den darunter auftretenden kardialen Veränderungen. Zum anderen bestätigen sie die Rolle der ANP-mRNA-Expression als linksventrikulärer Hypertrophiemarker. Nochmals unterstrichen wird diese Rolle auch in den Ergebnissen für die Gruppen W-NxACE und MWF-NxACE (siehe **Abbildung 13**)

Die Gabe von Ramipril führte in diesen Gruppen bei gleichzeitiger Regression der LVH zu einem Rückgang der mRNA-Expression von ANP auf das stammspezifische Ausgangsniveau. Die Ergebnisse stehen im Einklang mit den Befunden einer Arbeit, in denen ebenfalls ein Abfall der ANP-mRNA-Expression (und der ANP-Serumkonzentration) unter ACE-Hemmer-Therapie am Rattemodell beschrieben wurde. [66]

Unklar bleibt, ob das linksventrikulär exprimierte ANP über die Markerfunktion hinaus auch eine Bedeutung für die natriuretische Antwort des ANP hat.

Einen Hinweis darauf bietet die im Verhältnis zur LVH massiv erhöhte ANP-Expression in der Gruppe MWF-Nx (siehe **Abbildung 22**) Diese zusätzliche Expression von ANP könnte hier einen Beitrag zum höheren Natriuresebedarf bei

manifeste RVH der Tiere leisten. Dagegen spricht jedoch die Persistenz der RVH unter Ramiprilltherapie (MWF-NxACE) bei gleichzeitiger Regression der LVH und parallelem Absinken der ANP-Expression. Dies lässt den Schluß zu, dass in dieser Situation weiterhin ein erhöhter Bedarf an ANP aufgrund der RVH vorhanden ist, das natriuretisch wirksame ANP aber nicht im LV, sondern von anderen Bereichen des Myokards produziert wird. Eine adäquate Natriuresis wird in der Gruppe MWF-Nx bei persistierender RVH dennoch nicht geleistet.

Zusammenfassend konnte die vorliegende Arbeit erstmals zeigen, dass ein quantitativer Zusammenhang zwischen der linksventrikulären mRNA-Expression von ANP und einem Nephrondefizit sowohl operativer als auch genetischer Ursache besteht. Die Korrelation der mRNA-Expression mit der Kreatininclearance unterstreicht diesen Zusammenhang. Überdies konnte durch die lineare Korrelation mit dem linksventrikulären Gewicht und dem systolischen Blutdruck gezeigt werden, dass die linksventrikuläre mRNA-Expression von ANP einen Marker für eine zunehmende kardiale Druck- und Volumenbelastung und die daraus folgende LVH darstellt. Für die natriuretische Antwort ist das linksventrikuläre ANP wahrscheinlich nur von geringer Bedeutung.

#### **4.5 Veränderungen kardialer $Ca^{2+}$ -Transportprozesse**

Im ersten Teil der vorliegenden Arbeit konnten wir feststellen, dass ein direkter Zusammenhang zwischen einer verminderten Nephronanzahl und dem Anstieg des systolischen Blutdruckes, der Entwicklung einer LVH und der linksventrikulären mRNA-Expression von ANP besteht.

In den letzten Jahren hat sich eine hohe Beweislast angesammelt, dass Veränderungen der kardialen Calciumhomöostase im tierexperimentellen Modell sowie beim Menschen eine essentielle Rolle in der Genese und Progression der Herzinsuffizienz spielen. Insbesondere wird dem Calciumstoffwechsel eine wichtige Rolle in der Progredienz der Erkrankungen beigemessen [55, 91] [92].

Die kardiale Calciumhomöostase bei Vorliegen eines Nephronmangels ist weder am experimentellen Modell noch beim Patienten mit cNI gut untersucht. Dies ist erstaunlich, da lange bekannt ist, dass die LVH und die diastolische Dysfunktion auf dem Boden einer chronischen Niereninsuffizienz beim Menschen schon früh im Krankheitsverlauf eintritt und besonders schnell progredient ist. [40] [93]. Diese Tatsache und die gestörte systemische Calciumbalance bei Vorliegen eines

Nephronmangels machen Veränderungen des kardialen Calciumstoffwechsels bei cNI ebenfalls wahrscheinlich. Bisher existiert nur eine Arbeit, die den kardialen  $\text{Ca}^{2+}$ -Stoffwechsel an einem Rattenmodell mit cNI durch Nierenmassenreduktion (5/6-Nx) untersucht hat [54]. Keine Daten existieren jedoch zu einer differenzierteren Darstellung des  $\text{Ca}^{2+}$ -Stoffwechsels bei einer definiert verminderten Nephronanzahl operativer und genetischer Ursache.

Es stellten sich daher folgende Fragen, die wir mit dieser Arbeit beantworten wollten:

1. Kommt es in Modellen mit verminderter Nephronanzahl zu Veränderungen der kardialen Calciumhomöostase?
2. Existiert ein quantitativer Zusammenhang zwischen den Veränderungen des  $\text{Ca}^{2+}$ -Stoffwechsels und der funktionsfähigen Nephronanzahl?
3. Unterscheidet sich der  $\text{Ca}^{2+}$ -Stoffwechsel bei einem Modell mit genetisch verminderter Nephronanzahl im Vergleich zu einem Modell mit operativ induzierten Nephronverlust?

Grundsätzlich sind verschiedene Komponenten an der kardialen  $\text{Ca}^{2+}$ -Regulation beteiligt. Veränderungen betreffen jedoch insbesondere die Transportsysteme, die für den Auswärtstransport des  $\text{Ca}^{2+}$  in der Diastole des Herzens zuständig sind.

Dabei stellt sich ein innerer Zyklus über das SR sowie ein äußerer Zyklus über das Sarkolemm dar, die beide jeweils durch direkte und indirekte Faktoren in ihrer Funktion moduliert werden können. (siehe **Abbildung 4**)

Die Untersuchungen der beteiligten Komponenten erfolgten

1. auf mRNA-Ebene, um bestimmte Expressionsmuster erkennen zu können, die auf die Reaktivierung fetaler genetischer Expressionsprogramme hinweisen. Für die experimentelle und humane terminale Herzinsuffizienz sowie für die LVH konnten solche Muster bereits beschrieben werden. [91, 92]

2. auf funktioneller Ebene durch die Messung der „in vitro“-Transportaktivität des inneren und des äußeren Zyklus, die für den  $\text{Ca}^{2+}$ -Transport verantwortlich sind. Diese Messung vereint die Effekte von Expression und Modulation der jeweiligen Transportproteine.

Durch die Untersuchungen auf beiden Funktionsebenen kann der  $\text{Ca}^{2+}$ -Stoffwechsel in den Modellen mit verminderter Nephronanzahl umfassend charakterisiert werden.

#### **4.5.1 Diastolischer $\text{Ca}^{2+}$ -Rücktransport in das SR in vitro (innerer Zyklus)**

##### **4.5.1.1 SERCA2a-mRNA-Spiegel**

Die SERCA2a ist der Hauptmotor für die diastolische Entfernung von  $\text{Ca}^{2+}$  aus dem Intrazellulärraum in das SR: im Rattenmodell wird 90% des  $\text{Ca}^{2+}$  über diesen Weg in das SR zurückgeschleust. Damit ist die SERCA2a nicht nur für die schnelle und effektive Relaxation des Herzens verantwortlich, sondern erzeugt auch den Konzentrationsgradienten, der für die Bereitstellung des Calciums zur Kontraktion aus dem SR benötigt wird [60]. Eine nicht adäquat angepasste Expression kann eine verlangsamte diastolische Aufnahme von  $\text{Ca}^{2+}$  in das SR bedingen.

Ein wesentliches Ziel dieser Arbeit war die detaillierte Analyse der mRNA-Expression der SERCA2a bei definierter Nephronanzahl (Nephrondosis). Dazu wurde ein Modell mit operativer Nierenmassenreduktion, ein Modell mit genetisch verminderter Nephronanzahl sowie die Kombination aus operativem und genetischem Nephronmangel untersucht.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen eindeutig, dass es bei einer verminderten Nephronanzahl zu einer Dysregulation der Expression der SERCA2a auf mRNA-Ebene kommt. In der Gruppe mit der geringsten verbliebenen Nephronanzahl (MWF-Nx) kam es zu einem Abfall der mRNA-Expression der SERCA2a um 40% (siehe **Abbildung 14**). In den Gruppen MWF-Ko und W-Nx zeigte sich dagegen ein leichter Anstieg der mRNA-Expression der SERCA2a. Die verminderte mRNA-Expression der SERCA2a kann Ausdruck einer manifesten LV-Funktionsstörung bei den MWF-Nx Tieren sein. Als weiterer Beleg der kardialen Dysfunktion zeigt sich nur in dieser Gruppe eine RVH. Diese kann als Anzeichen einer bestehenden Rechtsherzdekompensation interpretiert werden.

Anders als im MWF-Nx-Modell war die mRNA-Expression der SERCA2a bei den W-Nx-Tieren nicht vermindert, sondern diskret erhöht. Dieser Befund steht im Widerspruch zu Befunden der Arbeit von Kennedy et al., die für das Modell der 5/6-Nx verminderte SERCA2a-mRNA-Spiegel zeigte [54]. Unveränderte oder erhöhte SERCA2a-mRNA-Spiegel sind jedoch als Akutreaktion auf kardiale Belastung (an Schweineherzen [94]) und bis zu vier Wochen nach Induktion einer druckinduzierten Herzbelastung an der Ratte ebenfalls beschrieben worden [95] [96].

Ergebnisse zur Regulation der SERCA2a auf mRNA-Ebene werden in der Literatur seit längerer Zeit kontrovers diskutiert. [60]

Einigkeit besteht darin, dass eine manifeste Herzinsuffizienz regelmässig mit einer verminderten mRNA-Expression und Funktion der SERCA2a einhergeht [91]. Ein Knockoutmodell der SERCA2a, das durch verminderte Kontraktilität und die Entwicklung einer LVH charakterisiert ist, stützt diese Vermutung [97]. Unklar ist, ob es zu einer kontinuierlichen Verminderung der mRNA-Expression mit zunehmender kardialer Belastung kommt, oder ob eine Verminderung der Expression erst den Übergang einer kompensierten LVH in eine Herzinsuffizienz markiert. Letzteres konnte in mehreren Arbeiten, in denen eine kompensierte LVH mit unveränderten mRNA-Spiegeln der SERCA2a einherging, gezeigt werden [98-100]. Ursächlich dafür wird eine Reaktivierung eines fetalen genetischen Expressionsprogrammes postuliert: Dieses Programm reguliert die fetale Herzentwicklung und ist durch niedrige mRNA-Spiegel der SERCA2a bei hohen mRNA-Spiegeln des NCX1 gekennzeichnet [59, 101, 102].

Unsere Ergebnisse stützen diese Hypothese: nur in der Gruppe MWF-Nx, die neben einer massiven LVH auch eine RVH mit Anzeichen einer kardialen Dekompensation zeigte, konnte eine Verminderung der mRNA-Expression der SERCA2a gezeigt werden.

Die Gabe eines ACE-Hemmers führte nur in der Gruppe W-NxACE zu einer Normalisierung der mRNA-Expression der SERCA2a, während die Expression der Gruppe MWF-NxACE vermindert blieb. Trotz einer effektiven RR-Senkung und einer Abnahme der LVH bestand bei den MWF-Nx Tieren die RVH fort.

Dies steht zunächst im Widerspruch zu Arbeiten, die eine Normalisierung der SERCA2a-mRNA-Expression durch ACE-Hemmung an reinen Überlastmodellen belegen konnten. [103]

Gleichzeitig stellt dieser Unterschied einen wichtigen Hinweis auf die blutdruckunabhängige Entstehung der LVH bei cNI dar. Diese erfolgt durch Faktoren, die scheinbar unabhängig von einer ACE-Hemmung Einfluß auf den Ca-Stoffwechsel nehmen können.

Das Ausbleiben der Normalisierung der mRNA-Expression der SERCA2a im MWF-Nx-Modell kann ausserdem Ausdruck einer starken Volumenbelastung bei stark fortgeschrittener Niereninsuffizienz sein. Die MWF-Nx Gruppe ist die Versuchsgruppe mit der niedrigsten Nephronanzahl. Gleichzeitig kann bei minimaler

Restnephronkapazität die ACE-Hemmung zu einer Volumenbelastung führen und eine LV-Funktionsstörung verstärken. Dies ist ebenfalls eine mögliche Interpretation des fehlenden Effekts der ACE-Hemmung auf die mRNA-Expression der SERCA2a.

Zusammenfassend unterstreichen die Befunde zur mRNA-Expression dieser Arbeit die Bedeutung der mRNA-Expression der SERCA2a für den Übergang der LVH in eine Herzinsuffizienz in Abhängigkeit von der zur Verfügung stehenden Nephronzahl bei cNI. Die bekannte Reaktivierung einer fetalen Expressionsprogrammes der SERCA2a erfolgt auch bei einer LV-Dysfunktion auf dem Boden eines ausgeprägten Nephronmangels.

#### **4.5.1.2 mRNA-Ratio von SERCA2a zu PLN**

Phospholamban ist maßgeblich an der Regulation der SERCA2a-Funktion beteiligt, in dem sie die Aktivität der SERCA2a inhibiert. Diese Hemmung wird jedoch bei verstärkter Aktivierung des Sympathikus mittels Phosphorylierung von PLN aufgehoben [104]. Damit stellt PLN ein wichtiges Bindeglied zwischen dem  $Ca^{2+}$ -regulierenden Stoffwechsel und der adrenergen Kreislaufaktivierung dar und spielt vermutlich eine zentrale Rolle bei den Pathomechanismen, die einer chronischen Herzbelastung zugrunde liegen [104]. Die Untersuchung der mRNA-Expression von PLN im Verhältnis zur SERCA2a ist daher für die Darstellung der gesamten SERCA2a-Funktion von grosser Bedeutung. Der Phosphorylierungszustand von PLN, der *in vivo* die Aktivität der SERCA2a maßgeblich beeinflusst, spielt auf mRNA-Ebene keine Rolle. Zudem führt die Anästhesie der Tiere mit Ketanest/Xylazin vor Organentnahme zu einer ausgeprägten Dephosphorylierung des PLN und spiegelt daher nicht den *in vivo*-Phosphorylierungszustand wieder. Deshalb haben wir in der vorliegenden Arbeit auf die Analyse des Phosphorylierungszustandes verzichtet. Das Verhältnis, in dem die SERCA2a und PLN zueinander auf mRNA-Ebene exprimiert werden (SERCA2a/PLN-Ratio), kann als Index für die Kontraktilität der Herzmuskelzelle genutzt werden [105].

Diese Arbeit zeigt erstmals Daten zur mRNA-Ratio von SERCA2a zu PLN für Modelle mit cNI bei verminderter Nephronanzahl.

Stammunabhängig war die Ratio weder nach Nx noch nach Ramipril Nx in Wistar- und MWF-Tieren verändert. Stammabhängig war die mRNA-Ratio von SERCA zu PLN in allen Behandlungsgruppen bei den MWF-Tieren signifikant erhöht (siehe

**Abbildung 15).** Es bestand damit ein deutlicher Unterschied in der Expression zwischen den Tierstämmen.

Eine erhöhte SERCA2a/PLN-Ratio wird häufig als Hinweis für eine verbesserte Herzfunktion interpretiert. [105] An dieser Stelle nicht veröffentlichte Befunde unserer Arbeitsgruppe zur LV-Funktion belegen aber klar einen erhöhten enddiastolischen Druck bei den MWF-Ko im Vergleich zu W-Ko. Darüber hinaus ist nach Nx auch die Relaxation des linken Ventrikels bei den MWF-Nx im Vergleich zu den W-Nx reduziert.

Also widerspricht die erhöhte Ratio in den MWF-Tieren mit gestörter LV-Funktion den gängigen Interpretationen. Eine mögliche Erklärung sind genetische Stammunterschiede, die zu einer anhaltend erniedrigten mRNA-Expression vom PLN im MWF-Stamm führen. Dafür, dass die erhöhte mRNA-Ratio von SERCA2a zu PLN Ausdruck eines Kompensationsversuches ist, gibt es keine überzeugenden pathophysiologischen Modelle.

#### **4.5.1.3 SERCA2a-katalysierter $Ca^{2+}$ Transport in Homogenaten**

Die Calciumtransportaktivität der SERCA2a über die Membran des sarkoplasmatischen Retikulums ist maßgeblich für den diastolischen  $Ca^{2+}$ -Rücktransport und damit für die Bereitstellung von  $Ca^{2+}$  für die folgende Herzaktion verantwortlich. Die Transportaktivität wird durch verschiedene Variablen wie die Anzahl der Transportermoleküle sowie deren Affinität zum freien  $Ca^{2+}$  durch Modulation durch Phospholamban beeinflusst. Wie bereits diskutiert spielt diese Modulation in unseren Untersuchungen keine Rolle, so dass die Transportaktivität in dieser Arbeit vor allem durch die Anzahl der Transportermoleküle in der SR-Membran determiniert ist.

Die vorliegende Arbeit ist die Erste, die den kardialen SERCA2a-Transport mittels oxalatunterstützter  $Ca^{2+}$ -Aufnahme in einem Tiermodell mit verminderter Nephronanzahl untersucht. Es konnten dabei keine wesentlichen Veränderungen der  $Ca^{2+}$ -Transportaktivität über die SERCA2a festgestellt werden. Lediglich in der Gruppe W-Nx war die Aktivität gegenüber der Kontrollgruppe leicht erniedrigt und normalisierte sich unter Gabe eines ACE-Hemmers (siehe **Abbildung 16**).

Diese Ergebnisse machen deutlich, dass die Veränderungen der mRNA-Expression der SERCA2a nicht in einer Veränderung der SERCA2a-Aktivität resultieren.

Eine direkte Abhängigkeit zwischen der SERCA2a-Aktivität und der funktionsfähigen Nephronanzahl besteht daher auch auf der funktionellen Ebene des SERCA2a-Transportes nicht.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit widersprechen damit Befunden verschiedener Arbeiten, in denen eine experimentelle Herzinsuffizienz unterschiedlicher Genese regelmässig mit einer Verminderung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Aufnahme über die SERCA2a einhergeht. So wurde für die humane terminale Herzinsuffizienz (meist Kardiomyopathie) und in einer Verschlechterung der SERCA2a-Funktion nachgewiesen. [106, 107] [108] [51] An dieser Stelle soll noch einmal betont werden, dass die o.g. Arbeiten zur SERCA2a-Funktion nicht an Patienten oder experimentellen Tiermodellen mit cNI bzw. verminderter Nephronanzahl erhoben wurden. Deshalb ist ein direkter Vergleich mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit nur sehr eingeschränkt möglich. Es gilt ausserdem zu bedenken, dass jede Form der cNI im Rahmen des sekundären HPT zu einer ausgeprägten Störung der intra- und extrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Homöostase führt.

Als mögliche Ursachen für einen normalen  $\text{Ca}^{2+}$ -Transport trotz einer LVH kommen eine veränderte Regulation der SERCA über PLN, oder, bei verminderter Dichte der Transporter, eine erhöhte Affinität der SERCA zu dem vorhandenen Calcium in Frage.

Weiterhin zeigt der Befund, dass trotz potentiell massiver Störungen des  $\text{Ca}^{2+}$ -Haushaltes bei der cNI die SERCA2a-Transportkapazität nicht beeinflusst ist. Dies legt nahe, dass die Balance der  $\text{Ca}^{2+}$ -Homöostase unter schwierigen Bedingungen wie bei Störungen des systemischen Calciumhaushaltes stabil gehalten werden kann, um dadurch einen adäquaten Kontraktionszyklus gewährleisten zu können. Das System scheint also von überlebenswichtiger Bedeutung für die Funktion des Herzens zu sein.

#### ***4.5.2 diastolischer $\text{Ca}^{2+}$ -Rücktransport nach extrazellulär über das Sarkolemm (äusserer Zyklus)***

Der kardiale NCX1 ist für den extrazellulären Anteil des  $\text{Ca}^{2+}$ -Auswärtstransportes in der Diastole verantwortlich. Beim Menschen beträgt dieser Anteil 30%, bei der Ratte nur 10% des Gesamttransportes von  $\text{Ca}^{2+}$  [55, 109] Der Transport ist elektrogen und wird von den Konzentrationsgradienten von  $\text{Na}^+$  und  $\text{Ca}^{2+}$  über der sarkolemmalen Membran bestimmt. Eine Erhöhung der kardialen mRNA-Expression von NCX1 (als

Ausdruck der Re-Expression eines fetalen genetischen Musters) sowie eine erhöhte Transportfunktion konnte für verschiedene Modelle der Herzhypertrophie (sowohl kompensiert als auch dekompenziert) gezeigt werden. [58] Pathophysiologisch handelt es sich bei dieser Reaktion wahrscheinlich um die kompensatorische Antwort auf eine erhöhte intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration bei verminderter SERCA2a-Aktivität [58]. Die vermehrte Nutzung des Transportes über den NCX1 gewährleistet so die adäquate Entfernung des  $\text{Ca}^{2+}$  in der Diastole. Unklar ist, ob und wie sich die kardiale Expression des NCX1 in einem Modell mit cNI durch verminderte Nephronanzahl verändert. Elektrolytveränderungen, wie sie bei der cNI regelmäßig auftreten (wie ein erhöhtes Gesamtkörpennatrium bei der chronischen Niereninsuffizienz oder erhöhtes  $\text{Ca}^{2+}$ ) könnten diese Gradienten und damit die Funktion des NCX1 zusätzlich beeinträchtigen.

#### **4.5.2.1 mRNA-Spiegel von NCX1**

Diese Arbeit zeigt erstmals Daten zur mRNA-Expression des NCX1 für ein Modell der cNI bei operativ und genetisch verminderter Nephronanzahl.

Die Ergebnisse zeigten, dass die kardiale mRNA-Expression von NCX1 stammabhängig bei allen MWF-Tieren im Vergleich zu den entsprechenden Wistargruppen stark erhöht war. In den Wistargruppen bewirkten dabei weder eine 5/6-Nx noch die Behandlung mit Ramipril eine deutliche Veränderung der mRNA-Expression von NCX1. In der Gruppe MWF-Nx war die Expression im Vergleich zu MWF-Ko leicht erhöht. (siehe **Abbildung 17**) Diese Ergebnisse legen nahe, dass kein direkter Zusammenhang der mRNA-Expression von NCX1 mit dem Ausmaß des Nephronverlustes besteht.

Dieser Befund stellt sich damit analog zu den Ergebnissen für die SERCA2a/PLN-Ratio dar und lässt ebenfalls auf einen stammabhängigen Unterschied in der mRNA-Expression von NCX1 schließen.

Eine Erhöhung der kardialen mRNA-Expression von NCX1 bei kompensierter LVH und Herzinsuffizienz ist allgemein bekannt und in vielen Arbeiten für verschiedenste Modelle der Herzbelastung beschrieben. [110] Unsere Ergebnisse bestätigen diese Befunde. Insbesondere in der Gruppe MWF-Nx zeigt sich deutlich dass fetale Expressionsmuster (verminderte mRNA-Expression der SERCA2a bei erhöhter NCX1-mRNA-Expression), dass vielfach als Begleitphänomen der Herzinsuffizienz beschrieben wurde [59, 91, 102, 111] Die Erhöhung der m-RNA-Expression von

NCX1 tritt dabei meist früher als die Verminderung der SERCA2a-Expression ein. In der vorliegenden Arbeit bestätigt sich dies in der Gruppe MWF-Ko, die bei noch unveränderter mRNA-Expression der SERCA2 eine erhöhte NCX1 Expression aufweist. Eine mögliche Ursache dafür können Lecks (SR-leaks) in der SR-Membran oder der RyR-Kanäle sein, die zu einer intrazellulären  $Ca^{2+}$ -Konzentrationserhöhung bei noch intakter SERCA2a-Funktion führen [112]. Unklar ist, warum trotz nachgewiesener LVH eine Erhöhung der mRNA-Expression von NCX1 in der Gruppe W-Nx ausbleibt. Einen ähnlichen Befund zeigt eine Arbeit von Kennedy et al., in der die kardiale mRNA-Expression von NCX1 sogar vermindert war [54]. Dies steht im Widerspruch zu der allgemeinen Annahme, dass eine LVH schon im kompensierten Stadium mit einer Erhöhung der mRNA-Expression von NCX1 einhergeht. Der Befund passt jedoch zu den Ergebnissen für die SERCA2a, die ebenfalls darauf hinweisen, dass das fetale Expressionsmuster in der Gruppe W-Nx nicht exprimiert wird.

Die Gabe eines ACE-Hemmers führte bei den Wistartieren zu keiner Veränderung der mRNA-Expression von NCX1. Bei den MWF-Tieren zeigte sich jedoch eine Abnahme der NCX1-Expression im Vergleich zu MWF-Nx. Diese Wirkung konnte für die mRNA-Expression der SERCA2a nicht beobachtet werden. Dies bestätigt Ergebnisse einer Arbeit von Wang et al. die ebenfalls eine Normalisierung der NCX1-Expression unter ACE-Hemmertherapie zeigen konnte [103].

Zusammenfassend zeigt sich, dass die mRNA-Expression von NCX1 auch bei der experimentell induzierten cNI bei genetisch vermindertem Nephrondefizit erhöht ist. Dies gilt jedoch nicht für das Modell des operativ induzierten Nephronverlustes, in dem die mRNA-Expression nicht verändert war. ACE-Hemmung konnte bei den MWF-Tieren eine Normalisierung der NCX1-Expression bewirken.

Die Untersuchung der funktionellen Ebene des NCX1 erfolgte wie die der SERCA2a an isolierten Homogenaten. Sie ist ein Maß für die *in vitro* -Transportkapazität des NCX1 und berücksichtigt die Konzentrationsgradienten, die die Funktion „in vivo“ beeinflussen, nicht.

#### **4.5.2.2 $Na^+$ -abhängiger sarkolemmaler $Ca^{2+}$ -Transport über den NCX1 in Homogenaten**

Die vorliegende Arbeit zeigt erstmals Daten zur  $\text{Ca}^{2+}$ -Transportaktivität des NCX1 an einem experimentellen cNI-Modell auf dem Boden eines Nephrondefizites.

Es stellte sich eine Erhöhung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Transportaktivität über den NCX1 in allen Gruppen mit verminderter Nephronanzahl dar. Diese Erhöhung war in den Wistargruppen deutlich stärker ausgeprägt als bei den MWF-Tieren.

Die Gabe eines ACE-Hemmers führte weder in W-NxACE noch in MWF-NxACE zu einer Normalisierung der Transportaktivität.

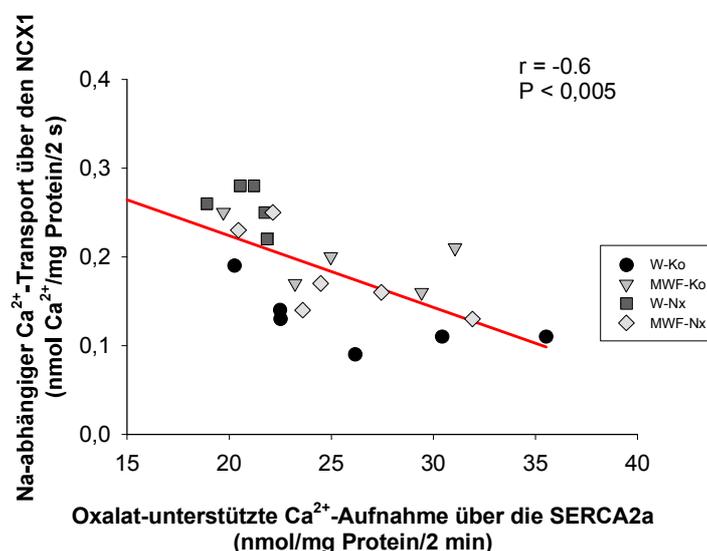
Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit machen deutlich, dass sich die Veränderungen in der mRNA-Expression des NCX1 nicht auf funktioneller Ebene widerspiegeln. Dies konnte ähnlich für die Ergebnisse der SERCA2a beobachtet werden (siehe dort). Solche Unterschiede zwischen Befunden von mRNA, Protein und funktioneller Ebene sind für den NCX1 (wie auch für die SERCA2a) mehrfach beschrieben. [113] [114] [77]

In der vorliegenden Arbeit zeigt sich insbesondere in der Gruppe W-Nx einen ausgeprägten Unterschied zwischen unveränderter mRNA-Expression und erhöhter NCX1-Funktion. Dies kann Hinweis auf eine post-translationale Regulation der NCX1-Funktion sein. Dafür kommt unter anderem eine allosterische Modulation des NCX1 durch das so genannte exchanger inhibitory peptide (XIP) in Frage. Die Wirkungen des XIP sind jedoch noch ungenügend untersucht. [115] [116]

Generell bestätigen die vorliegenden Ergebnisse die Befunde mehrerer Arbeiten, die ebenfalls eine Erhöhung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Transportaktivität über den NCX1 insbesondere an genetischen Modellen für eine Überlasthypertrophie darstellen konnten: Kardiomyopathie beim Syrischen Hamster [117, 118], SHR-Ratte nach 4 Wochen [119] und nach 22 Wochen [120]. Auch für die terminale Herzinsuffizienz des Menschen ist eine erhöhte Aktivität beschrieben [78]. Die Datenlage stellt sich jedoch kontrovers dar, da ebenso viele Arbeiten eine verminderte Aktivität des NCX1 beobachteten [121] [122] [114]. Die Ursache für die Diskrepanz dieser Befunde ist unklar. Es kommen aber speziesbedingte Unterschiede oder eine unterschiedliche Aktivität des NCX1 in verschiedenen kardialen Regionen in Frage.

Pathophysiologisch liegt einer Erhöhung des  $\text{Ca}^{2+}$ -Transportes mittels NCX1 wahrscheinlich eine kompensatorische Reaktion bei erhöhter intrazellulärer  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration zugrunde [58]. Diese kann durch eine verminderte SERCA2-Aktivität, beim verstärkten Auftreten so genannter SR-Leaks oder durch einen unbekanntem Mechanismus verursacht sein. Die Korrelation zwischen SERCA2a-

Transportkapazität und NCX1-Transportkapazität unterstreichen diesen kompensatorischen Mechanismus.



**Abbildung 23:** Korrelation zwischen dem Ca<sup>2+</sup>-Transport über den NCX1 und dem Ca<sup>2+</sup>-Transport über die SERCA2a.

Bei der Interpretation muss jedoch bedacht werden, dass die differierenden Befunde auch genetischen Unterschieden des jeweiligen Stammes zugeschrieben werden können und nicht der kompensatorischen Funktion. Dies würde auch die unklaren Unterschiede zwischen Wistar- und MWF-Tieren erklären.

Die Gabe eines ACE-Hemmers hatte auf die Ca<sup>2+</sup>-Transportaktivität des NCX1 (bei gleichzeitiger Normalisierung der mRNA-Expression) keinen Einfluss. Die Ursache für diese Diskrepanz zwischen funktioneller und mRNA-Ebene ist unklar. Es gibt bisher allerdings keine Vergleichsarbeit, die den Na<sup>+</sup>-abhängigen Ca<sup>2+</sup>-Transport über den NCX1 bei ACE-Hemmergabe untersucht hat. Auch hier kommt eine Regulation durch andere Faktoren in Frage.

Zusammenfassend zeigen die Befunde, dass es bei allen Tieren mit einem Nephrondefizit zu einer Erhöhung des Na<sup>+</sup>-abhängigen Ca<sup>2+</sup>-Transportes über den NCX1 kommt, diese aber nur in den MWF-Tieren von einer erhöhten mRNA-Expression begleitet ist. Dies kann ein Hinweis auf einen kompensatorischen Auswärtstransport sein, um trotz erhöhter intrazellulärer Ca<sup>2+</sup>-Konzentration eine adäquate Relaxation des Herzens zu gewährleisten.

Ein ACE-Hemmer hat auf funktioneller Ebene keinen Einfluss auf die NCX1-Transportaktivität.