

3 Ergebnisse

3.1 Arterieller Blutdruck

Nach achtwöchiger Salzbelastung stieg der systolische Blutdruck (SBD) der salzsensiblen SBH/y Ratten im Vergleich zu den DOCA-salzbelasteten salzresistenten SBN/y Tieren ($p = 0,003$) sowie im Vergleich zu den SBH/y Ratten ohne Salzzufuhr ($p < 0,001$) signifikant an. Der selektive ET_A -Rezeptorantagonist Darusentan schwächte den Blutdruckanstieg der SBH/y Tiere nach DOCA-Salzbehandlung signifikant ab ($p < 0,001$), die Blutdruckwerte blieben aber erhöht im Vergleich zu den unbehandelten SBH/y Ratten ($p < 0,0001$)(Abb. 2).

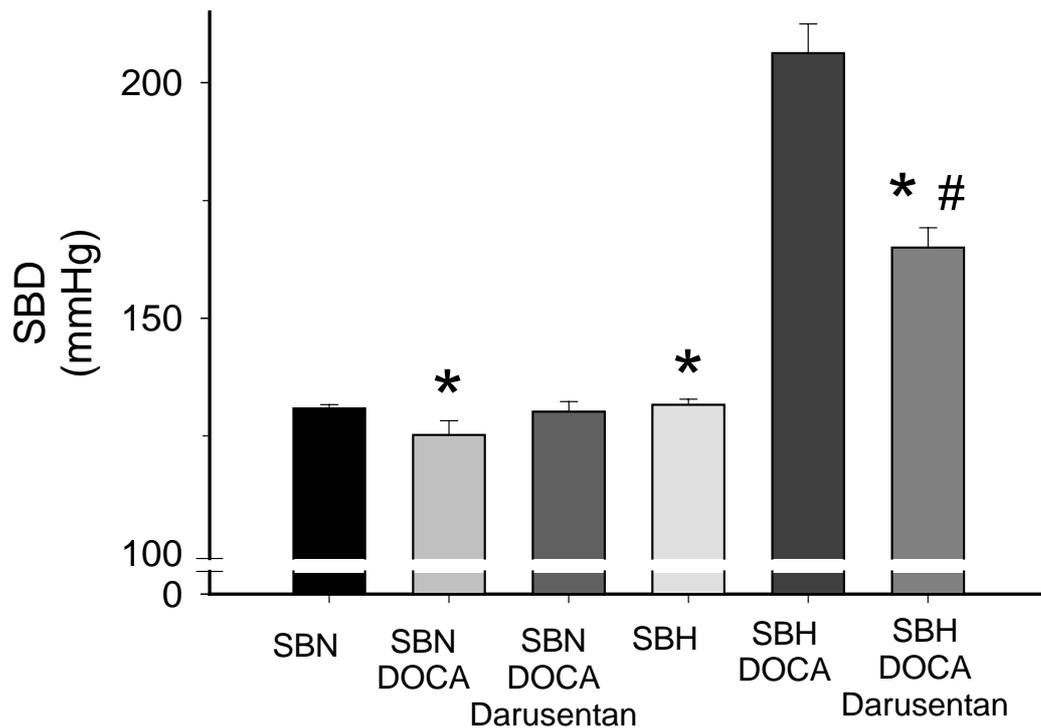


Abbildung 2: Systolischer Blutdruck (SBD); Desoxycorticosteronacetat (DOCA); Darusentan, selektiver ET_A -Rezeptorantagonist; $n = 8-15$ in jeder Gruppe; * $P < 0,05$ vs. SBH/y DOCA; # $P < 0,05$ vs. SBH/y

3.2 Körpergewicht und Nierengewicht

Unmittelbar vor der Organentnahme wurde das Körpergewicht aller Tiere bestimmt. Die Gruppe der Ratten, die mit dem ET_A-Rezeptorantagonisten behandelt wurde, war signifikant schwerer als die Gruppe der unbehandelten Tiere (Tab. 2).

Zwischen den Nieren der unbehandelten SBN/y und SBH/y Tiere ergab sich kein Unterschied hinsichtlich des Gewichts. Die Salzbelastung erhöhte das Nierengewicht bei beiden Tierlinien. Dieser Effekt wurde durch die Darusentangabe nicht beeinflusst.

Das Nierengewicht zeigt, normalisiert auf das Körpergewicht, trotz des vergleichsweise hohen Körpergewichts einen signifikant höheren Wert bei der mit Darusentan behandelten Tiergruppe.

Das relative Herzgewicht war bei den unbehandelten Ratten der beiden Linien sowie bei der salzbelasteten SBN/y-DOCA Gruppe mit und ohne ET_A-Rezeptorblockade gleich. Die SBH/y Linie zeigte auf die DOCA-Salz Belastung einen relativen Anstieg des linksventrikulären Gewichts um 30% verglichen mit der SBN/y DOCA Gruppe. Durch Darusentangabe konnte dieser Anstieg vollständig verhindert werden (Tab. 2).

Tabelle 2: Gewichtsvergleiche der experimentellen Gruppen

Experimentelle Gruppen	KG (g)	HG/KG (mg g ⁻¹)	NG/KG (mg g ⁻¹)
SBN/y	328±5,4	2,6±0,05	2,4±0,03
SBN/y-DOCA	319±5,0	2,6±0,10*	2,6±0,05*
SBN/y-DOCA-Da	345±6,9	2,4±0,08	2,7±0,08
SBH/y	359±3,1	2,6±0,05*	2,6±0,07*
SBH/y-DOCA	340±8,9	3,3±0,14	3,0±0,08
SBH/y-DOCA-Da	377±7,4*	2,8±0,11*	3,2±0,06 [#]

KG (Körpergewicht), HG/KG (normalisiertes Herzgewicht), NG/KG (normalisiertes Nierengewicht); Da = Darusentan, selektiver ET_A-Rezeptorantagonist; n = 8-15 in jeder Gruppe; *P < 0,05 vs. SBH/y DOCA; [#]P < 0,001 vs. SBH/y; Mittelwert ± SEM

3.3 Albuminurie

Die Untersuchung der Albuminurie zeigte ähnlich deutliche Unterschiede zwischen den Referenzgruppen wie der SBD. Die DOCA-Salzbelastung ließ die Albuminkonzentration bei den SBH/y Ratten um das 23fache ansteigen verglichen mit den Kontrolltieren derselben Linie und den SBN/y Ratten nach DOCA-Salzgabe. Die Behandlung der DOCA-Salzbelasteten SBH/y Ratten mit dem ET_A-Antagonist reduzierte diesen Anstieg der Albuminurie um 63% bezogen auf die Tiere ohne Rezeptorblockade, die Albuminurie war aber immer noch erhöht verglichen mit den SBH/y Ratten ohne Salzbelastung. Auch im Vergleich mit den drei unterschiedlich behandelten Gruppen der SBN/y Linie ist die Albuminkonzentration im Urin bei den SBH/y/DOCA Ratten signifikant erhöht (Abb. 3).

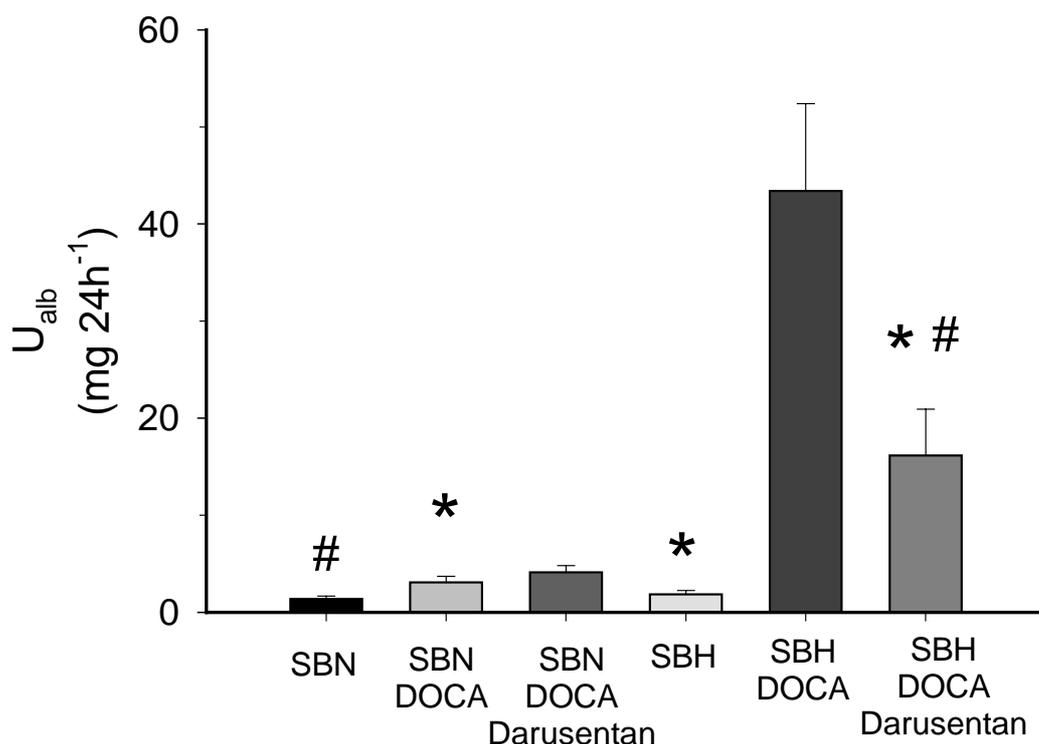


Abbildung 3: Albuminausscheidung; Desoxycorticosteronacetat (DOCA); Darusentan, selektiver ET_A-Rezeptorantagonist; *n* = 8-15 in jeder Gruppe; **P* < 0,05 vs. SBH/y DOCA; #*P* < 0,05 vs. SBH/y

3.4 Natrium- und ET-1-Konzentration im Urin

Die Behandlung mit DOCA verursachte in beiden Tierlinien einen signifikanten und ähnlichen Anstieg der Natrium- und der ET-1-Konzentration im Urin, der durch die Blockade des ET_A-Rezeptors unbeeinflusst blieb (Abb. 4 und Abb. 5).

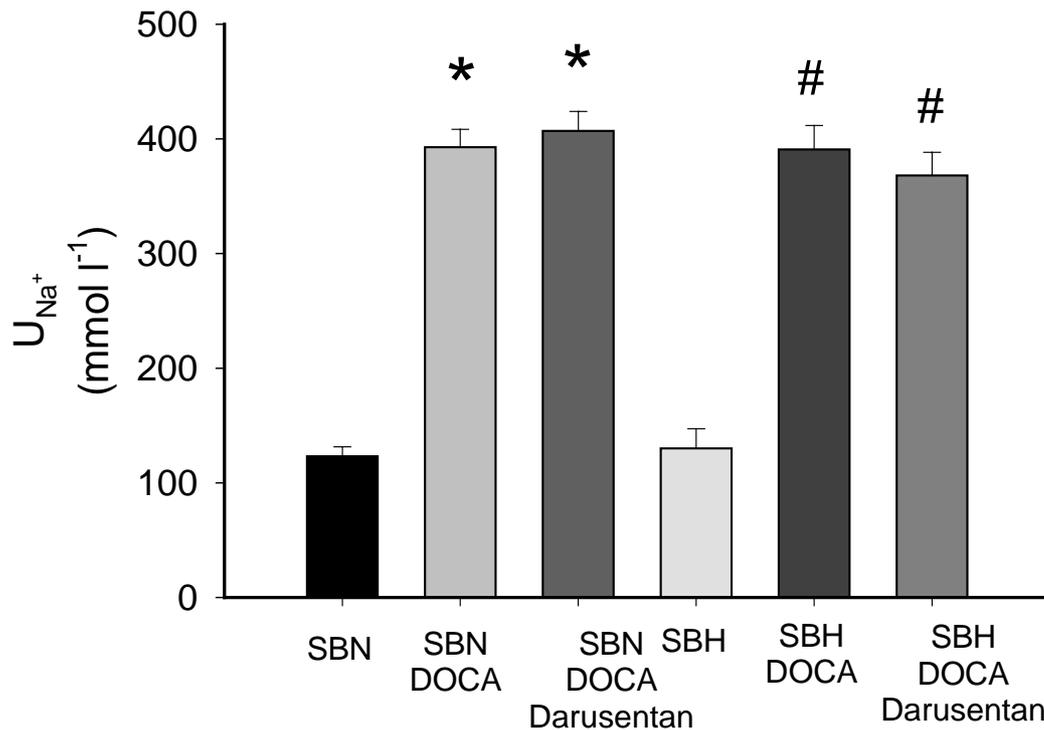


Abbildung 4: Natriumausscheidung; Desoxycorticosteronacetat (DOCA); Darusentan, selektiver ET_A-Rezeptorantagonist; *n* = 8-15 in jeder Gruppe; **P* < 0,05 vs. SBN/y; #*P* < 0,05 vs. SBH/y

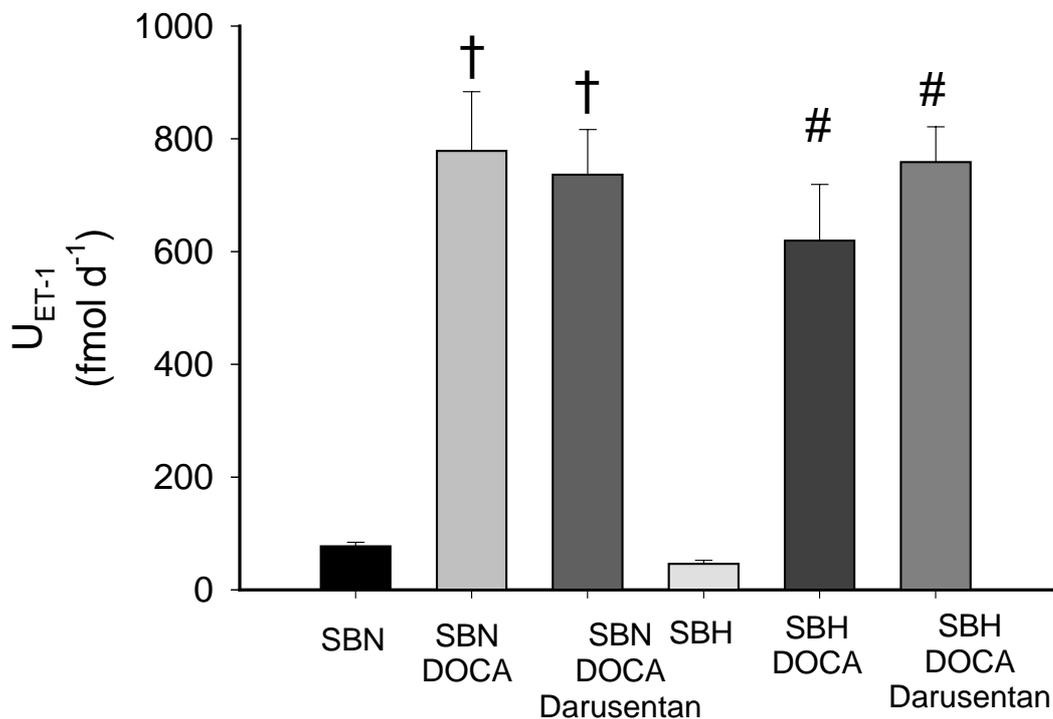


Abbildung 5: ET-1 Ausscheidung; Desoxycorticosteronacetat (DOCA); Darusentan, selektiver ET_A-Rezeptorantagonist; $n = 8-15$ in jeder Gruppe; † $P < 0,05$ vs. SBN/y; # $P < 0,05$ vs. SBH/y

3.5 Glomerulosklerose-Index und tubulointerstitieller Schädigungsindex

Um die Bewertungsparameter zu verdeutlichen, sind histologische Schnitte dargestellt. Für jede Tiergruppe ist exemplarisch ein Glomerulus in 200 facher Vergrößerung abgebildet.

Auf dem ersten Schaubild (Abb. 6) ist ein Glomerulus eines salzbelasteten SBH/y Tiers zu sehen. Deutlich sind eine Abnahme der Kapillardichte und die Einlagerung von amorphem Material erkennbar. Die nachfolgende Abbildung (Abb. 7) zeigt den histologischen Schnitt durch die Niere eines Tiers der salzresistenten SBN/y Gruppe. Es sind keine pathologischen Auffälligkeiten wahrnehmbar. Die dritte Histologie (Abb. 8) zeigt einen Glomerulus einer salzbelasteten SBH/y Ratte nach Behandlung

mit dem selektiven ET_A -Rezeptorantagonisten Darusentan. Es zeigen sich deutlich weniger Schädigungsparameter als bei den unbehandelten salzbelasteten SBH/y Tieren. Auf der letzten Darstellung (Abb. 9) ist ein Glomerulus einer DOCA-salzbelasteten SBN/y Ratte sichtbar, die zusätzlich den selektiven ET_A -Rezeptorantagonisten Darusentan erhalten hat. Es sind keine histologischen Läsionen nachzuweisen.

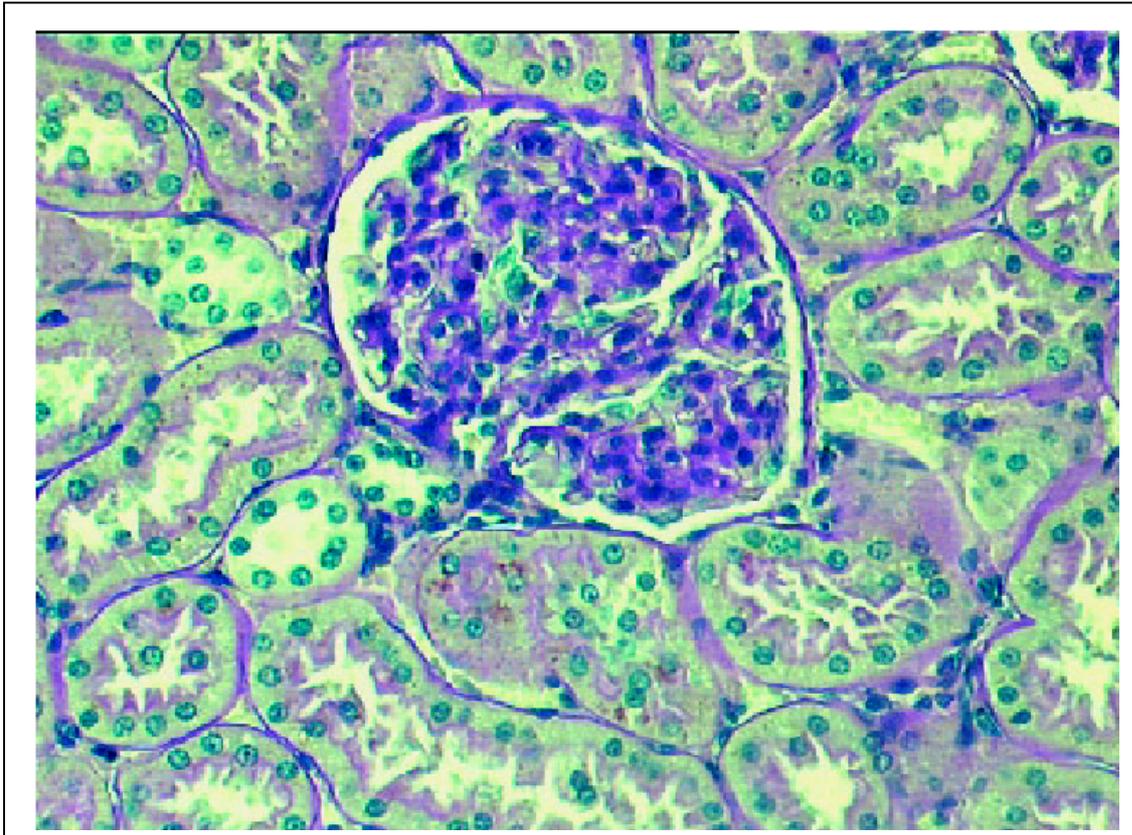


Abbildung 6: SBH/y nach DOCA-Salzbelastung, Desoxycorticosteronacetat (DOCA)

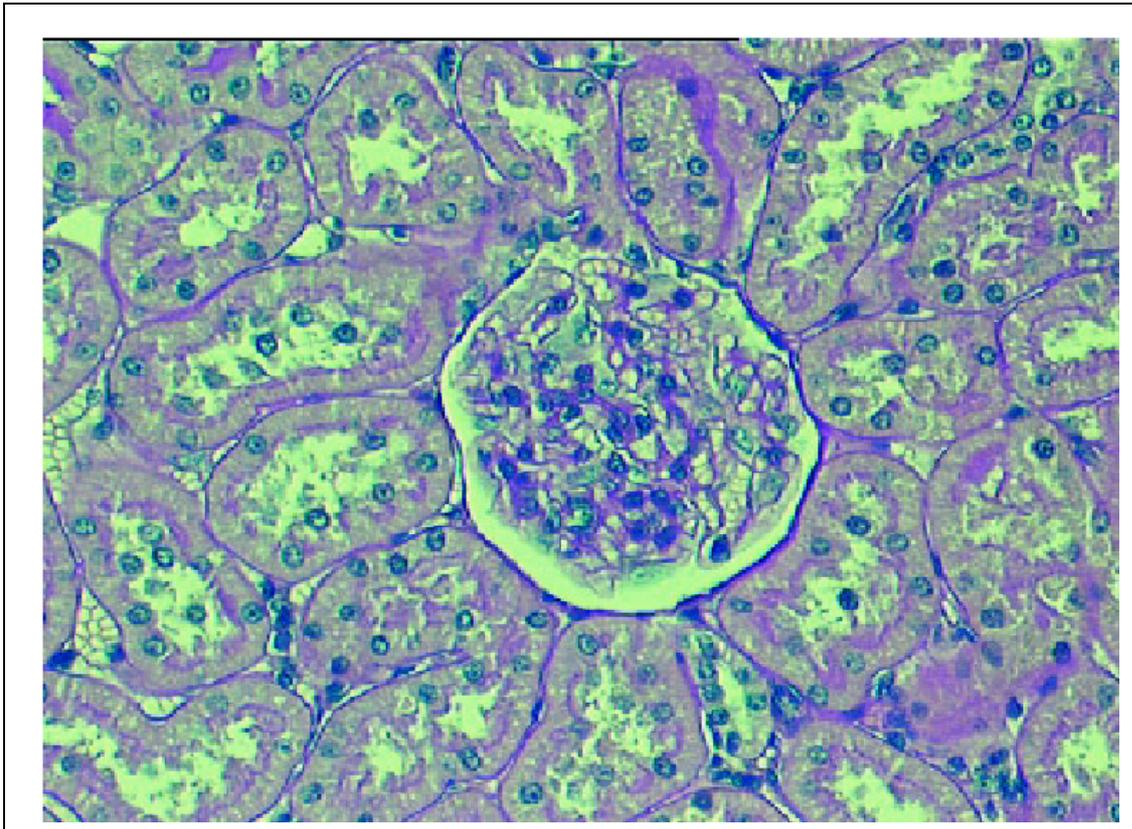


Abbildung 7: SBN/y nach DOCA-Salzbelastung, Desoxycorticosteronacetat (DOCA)

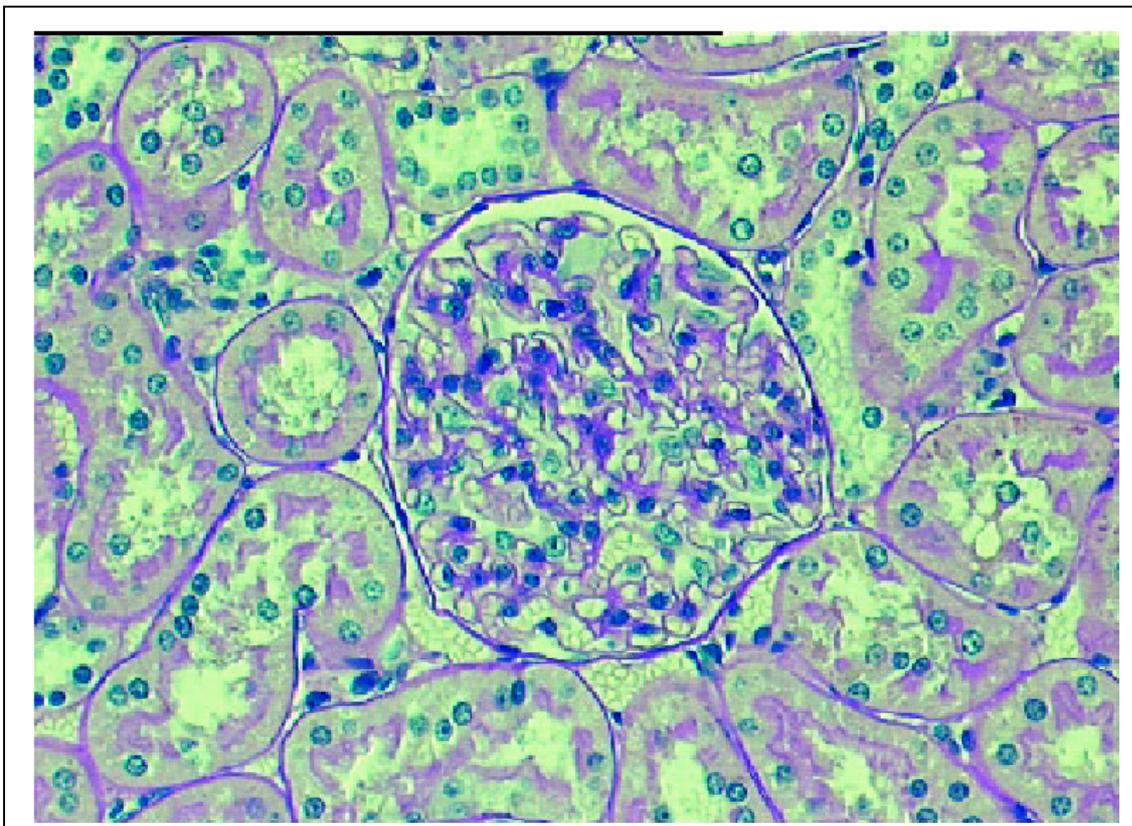


Abbildung 8: SBH/y nach DOCA-Salzbelastung und Darusentangebe; Desoxycorticosteronacetat (DOCA), Darusentan, selektiver ET_A-Rezeptorantagonist

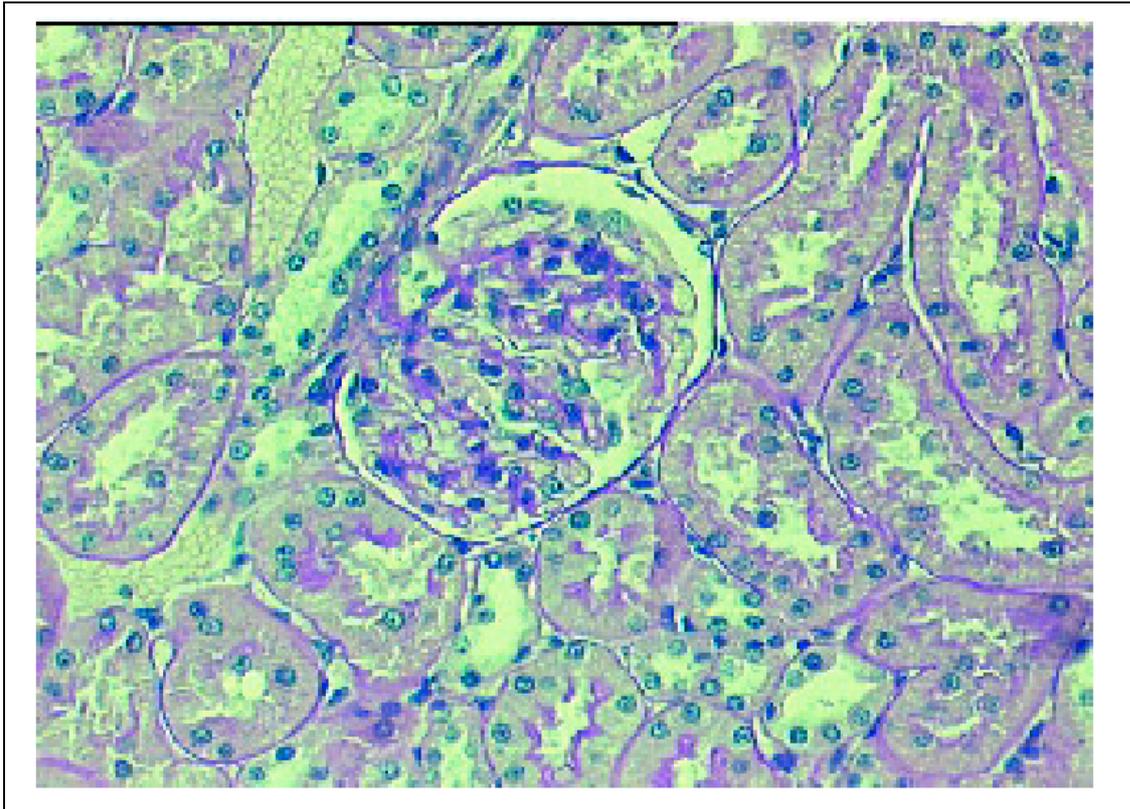


Abbildung 9: SBN/y nach DOCA-Salzbelastung und Darusentangabe; Darusentan, selektiver ET_A -Rezeptorantagonist

Die Werte der beiden Indizes ähnelten sich bei den Kontrollgruppen beider Tierlinien. Die resistente SBN/y Gruppe zeigte durch die Salzbelastung mit und ohne zusätzliche Behandlung mit dem ET_A -Rezeptorantagonisten Darusentan keinen Unterschied zu den unbehandelten Referenztieren (SBN/y). Bei den SBH/y Ratten waren Glomerulosklerose-Index und tubulointerstitieller Schädigungsindex im Vergleich zu den DOCA-Salzbelasteten SBN/y Tieren durch die Salzbelastung signifikant erhöht. Durch die Blockade des ET_A -Rezeptors konnten die beiden erhöhten Schädigungsindizes der salzbelasteten SBH/y Ratten normalisiert werden (Abb. 10 und Abb. 11).

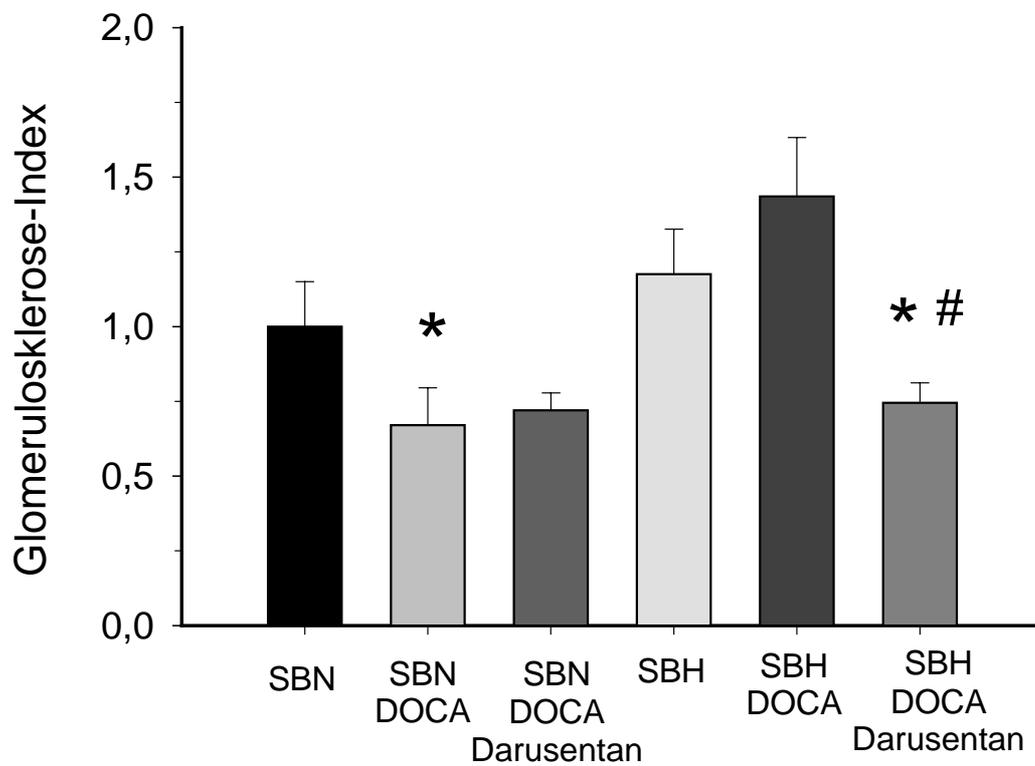


Abbildung 10: Glomerulosklerose-Index; Desoxycorticosteronacetat (DOCA), Darusentan, selektiver ET_A -Rezeptorantagonist; $n = 8-15$ in jeder Gruppe; * $P < 0,05$ vs. SBH/y DOCA; # $P < 0,05$ vs. SBH/y

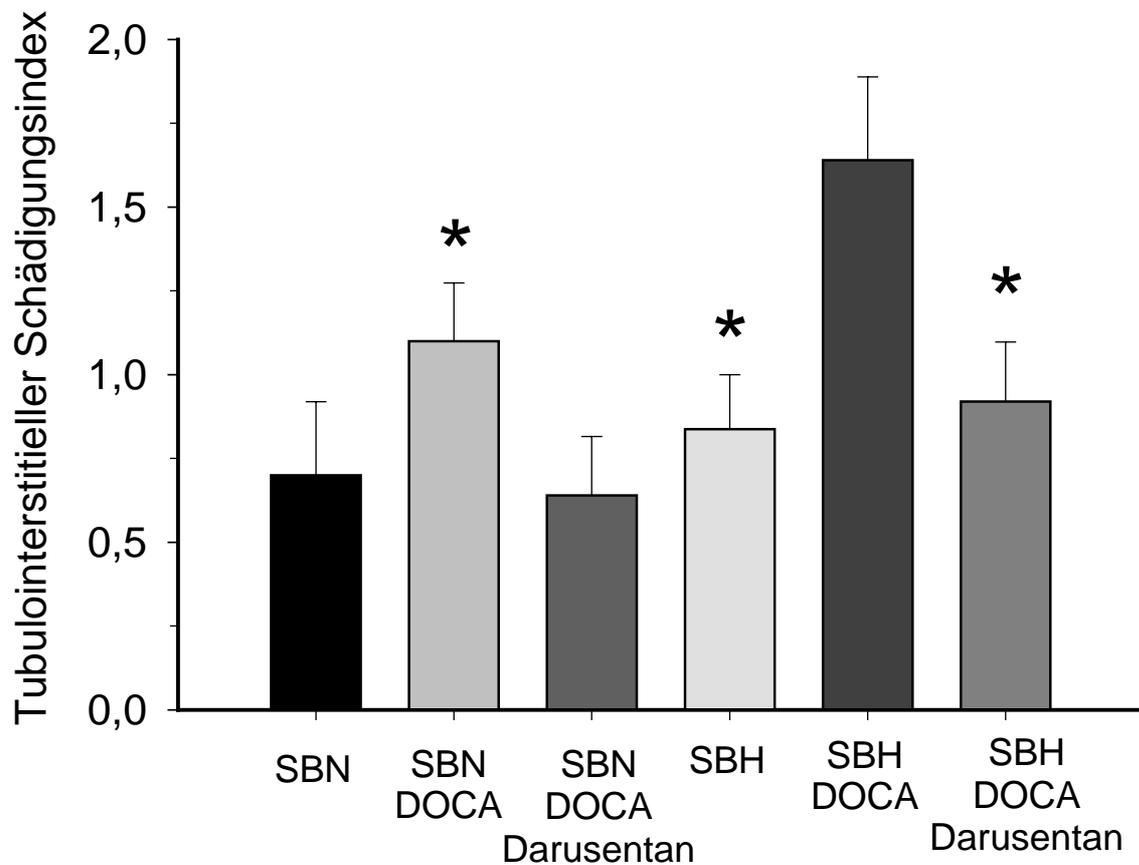


Abbildung 11: Tubulointerstitieller Schädigungsindex; Desoxycorticosteronacetat (DOCA); Darusentan, selektiver ET_A-Rezeptorantagonist; $n = 8-15$ in jeder Gruppe; * $P < 0,05$ vs. SBH/y DOCA

3.6 Northern Blot-Analyse

3.6.1 Expression der renalen Osteopontin mRNA

Die renale Osteopontin Expression war bei den unbehandelten SBH/y höher als bei der Referenzgruppe SBN/y. Die Salzbelastung führte zu einem Expressionsanstieg innerhalb beider Linien. Der vorbestehende Unterschied zwischen den beiden Gruppen wurde darüber hinaus durch die DOCA-Salzbelastung verstärkt ($p < 0,01$).

Die Behandlung mit dem ET_A-Rezeptorantagonisten Darusentan zeigte keinen Einfluß auf die Osteopontin mRNA Expression in den Nieren der mit DOCA und Darusentan behandelten salzresistenten SBN/y Tieren verglichen mit den salzbelasteten SBN/y Ratten ohne den Rezepeorantagonisten. Die Blockade des ET_A-Rezeptors bei den DOCA-salzbelasteten SBH/y Tieren war dagegen mit einer im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe (DOCA-salzbelastete SBH/y Ratten) 37%igen Reduktion der renale Osteopontin Expression verbunden (Abb.12).

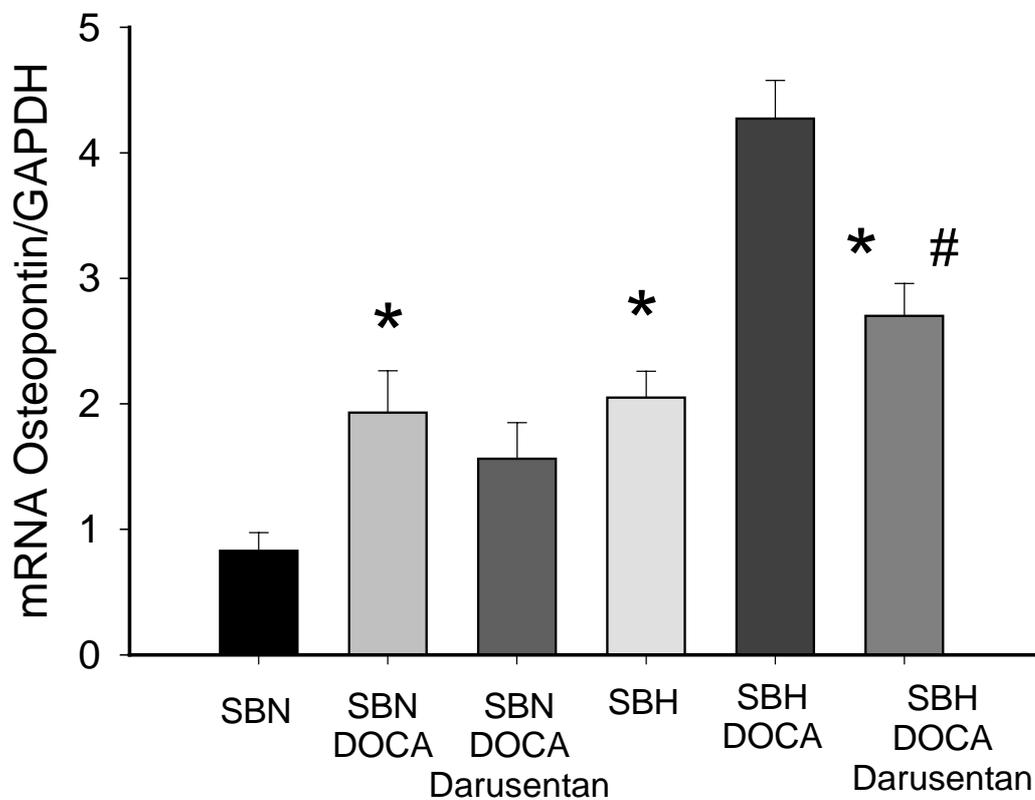


Abbildung 12: Osteopontin mRNA Expression; Desoxycorticosteronacetat (DOCA); Darusentan, selektiver ET_A-Rezeptorantagonist; *n* = 8-15 in jeder Gruppe; **P* < 0,05 vs. SBH/y DOCA; #*P* < 0,05 vs. SBH/y

Darüberhinaus wurde zwischen dem tubulointerstitiellem Schädigungsindex und der Osteopontin mRNA Expression in der Niere eine signifikante Korrelation gefunden (Abb. 13).

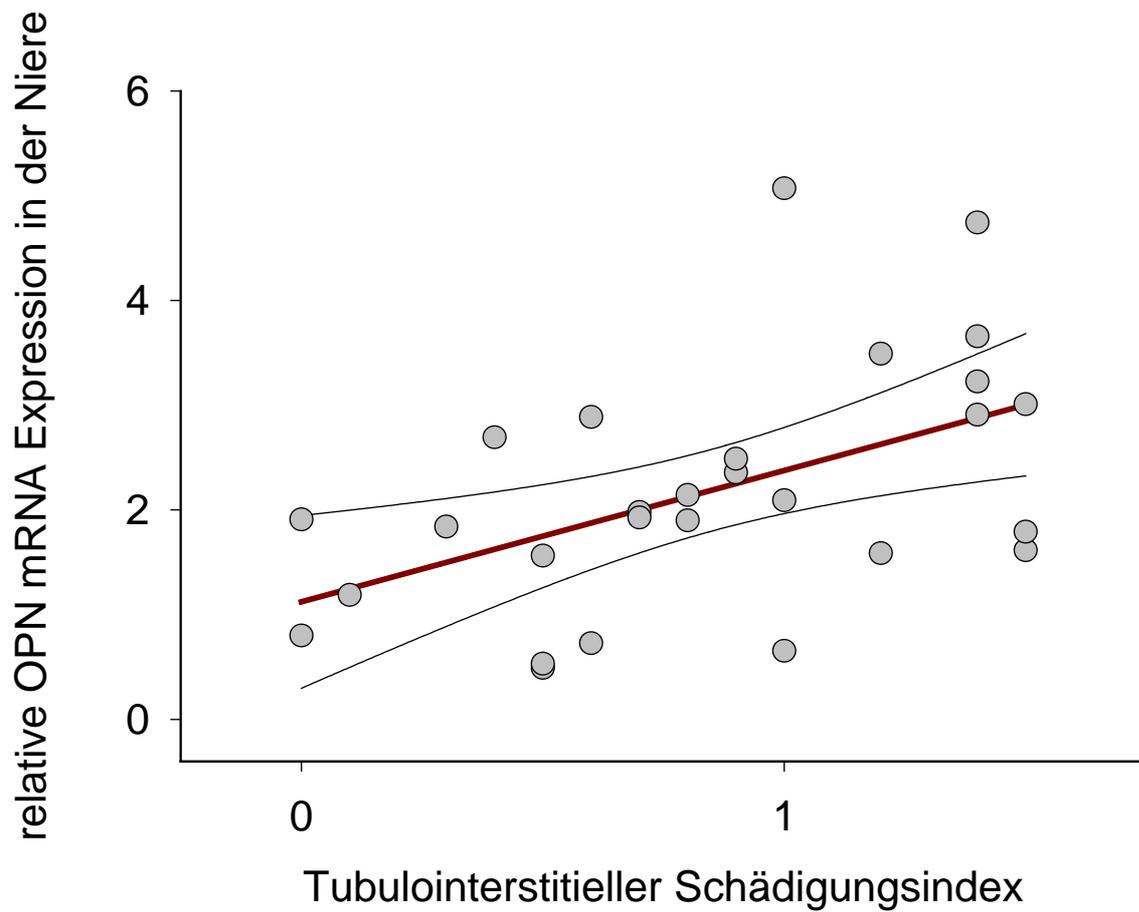


Abbildung 13: Osteopontin mRNA Expression im Verhältnis zum tubulointerstitiellem Schädigungsindex; $n = 8-15$ in jeder Gruppe; $r = 0,5$; $P < 0,05$

3.6.2 Expression der renalen ET_A - und ET_B -Rezeptor mRNA

Zwischen den Tiergruppen konnten keine Unterschiede hinsichtlich der ET_A -Rezeptor Expression in der Niere nachgewiesen werden (Abb. 14).

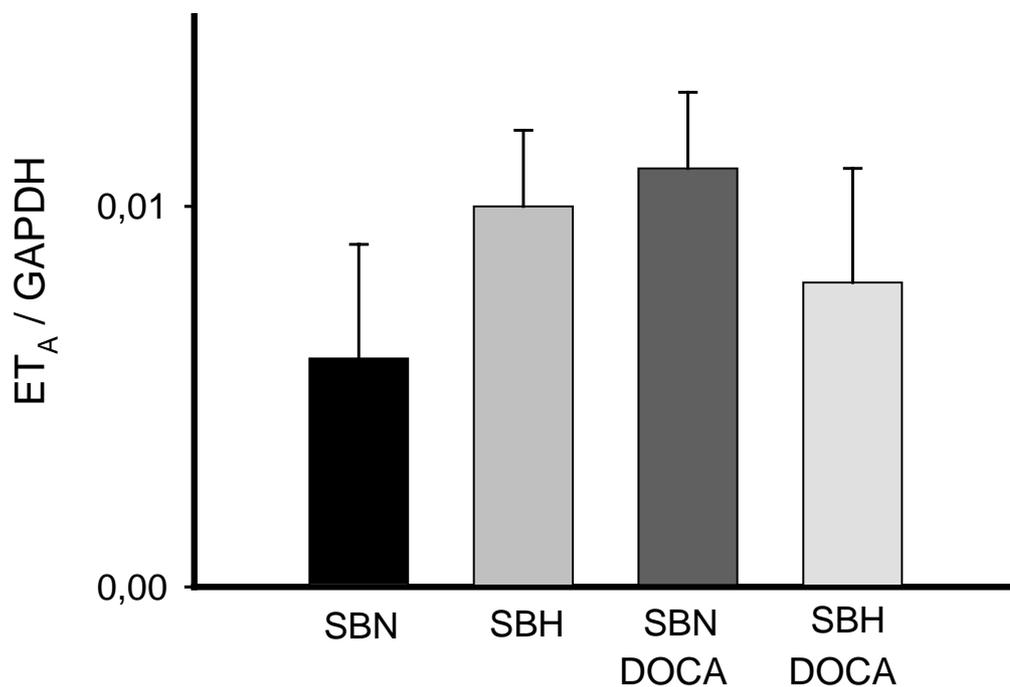


Abbildung 14: ET_A -Rezeptor mRNA Expression; $n = 8-15$ in jeder Gruppe

Die ET_B-Rezeptor mRNA Expression ergab bei den unbeeinflussten Tieren der salzsensitiven Linie erhöhte Werte. Dieser signifikante Unterschied konnte nach Salzbelastung nicht mehr nachgewiesen werden (Abb. 15).

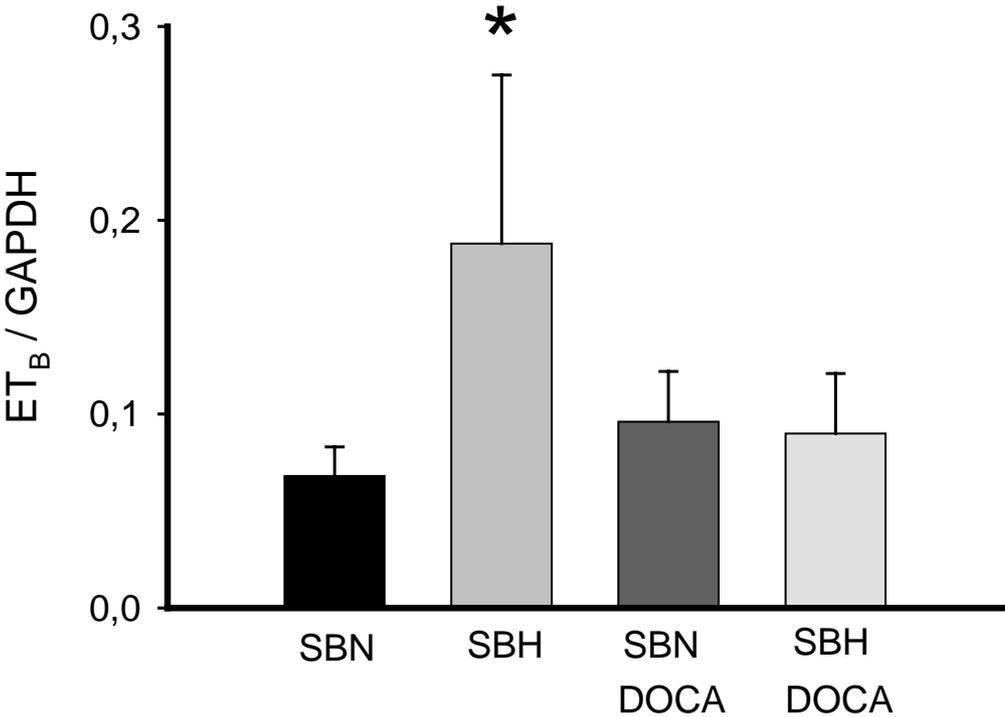


Abbildung 15: ET_B-Rezeptor mRNA Expression; n = 8-15 in jeder Gruppe

3.7 Endothelinrezeptordichte

Ein typisches Beispiel für die ET_A -Rezeptorbindung in der Niere einer salzbelasteten SBH/y Ratte im Vergleich mit einem salzbelasteten Tier der salzresistenten Linie ist in Abbildung 16 dargestellt. Die unterschiedlich stark ausgeprägte Rezeptorbindung der beiden Linien nach DOCA-Salz Belastung ist deutlich ersichtlich (Abb. 16 und Abb. 17).

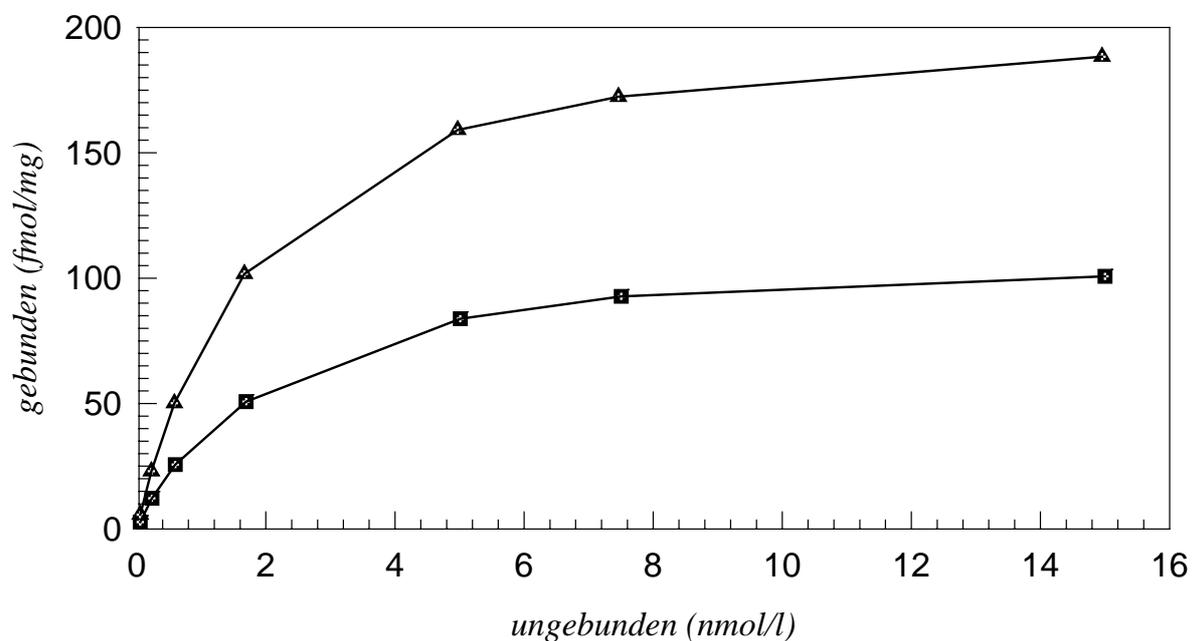


Abbildung 16: ET_A -Rezeptorbindung SBH/y (Dreieck) im Vergleich mit SBN/y (Quadrat)

Derjenige Wert, dem sich die Asymptote annähert, der aber nie vollständig erreicht wird als B_{max} bezeichnet. Er ist das Maß für die Rezeptordichte und wird bei der Linearisierung der Asymptote im Scatchard-Plot als Schnittpunkt mit der x-Achse dargestellt. Das Diagramm zeigt den zu Abb. 16 gehörenden Plot.

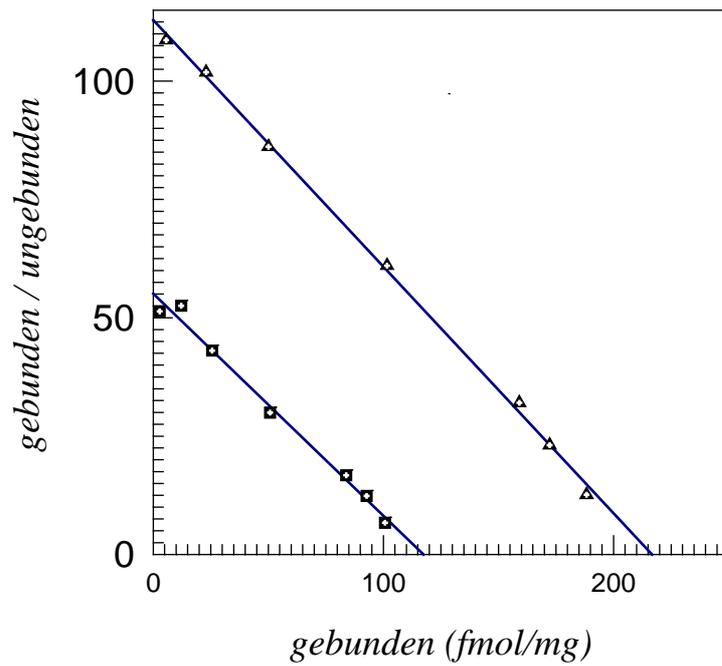


Abbildung 17: ET_A -Rezeptorbindung SBH/y (Dreieck) im Vergleich mit SBN/y (Quadrat)

Der Schnittpunkt der Regressionsgeraden (linear) mit der Abszisse liegt in diesem Fall für das salzbelastete Tier bei 210 fmol/mg, für das salzbelastete SBN/y Tier bei 110 fmol/mg.

3.7.1 ET_A -Rezeptordichte

Die ET_A -Rezeptordichte war bei den salzbelasteten SBH/y-DOCA Ratten signifikant höher als bei den salzbelasteten SBN/y-DOCA Tieren (Abb. 18).

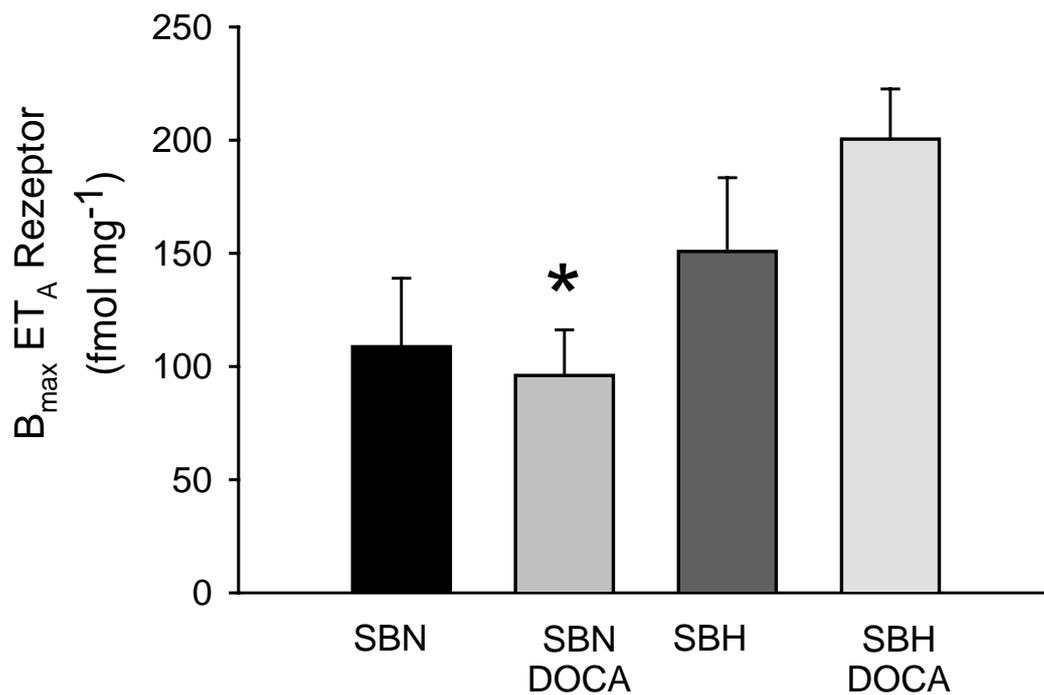


Abbildung 18: ET_A Rezeptordichte; Desoxycorticosteronacetat (DOCA); $n = 6-7$ in jeder Gruppe; * $P < 0,05$ vs. SBH/y DOCA

3.7.2 ET_B -Rezeptordichte

Die Betrachtung der Ergebnisse aller Vertreter der unbeeinflussten und der salzbelasteten Ratten beider Linien zeigt, dass kein Unterschied in der ET_B -Rezeptordichte zwischen den beiden Gruppen vor und nach Salzbelastung besteht (Abb.19).

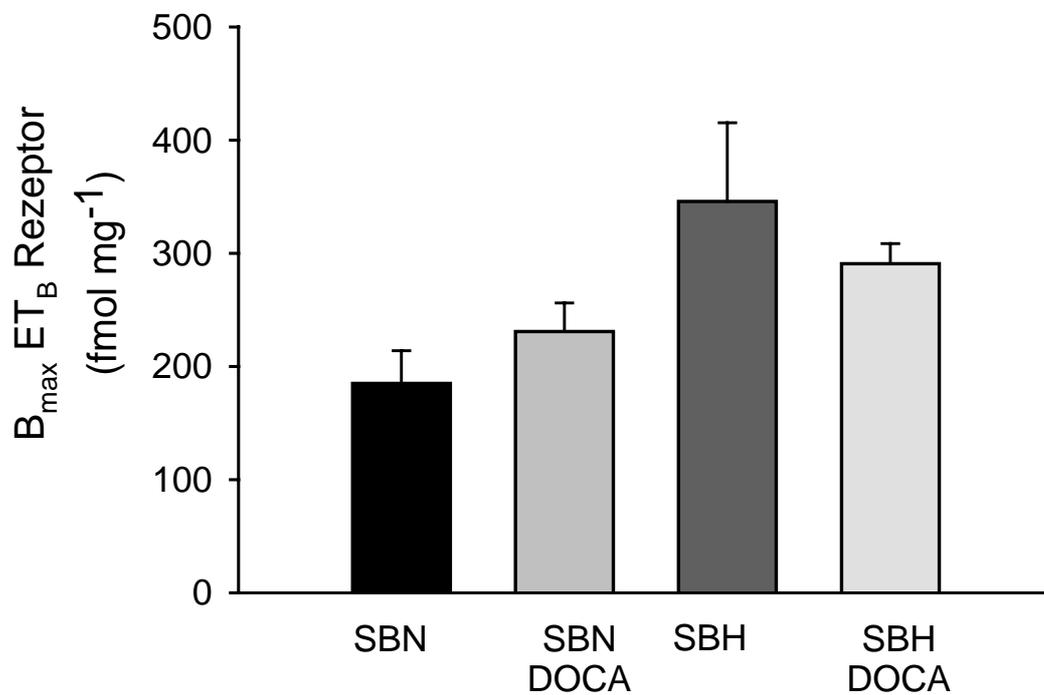


Abbildung 19: ET_B Rezeptordichte; DOCA, Desoxycorticosteronacetat; $n = 6-7$ in jeder Gruppe

3.7.3 ET_A/ET_B Verhältnis

Setzt man nun die beiden Rezeptordichten zueinander ins Verhältnis, so erhält man den Quotienten ET_A/ET_B . Dieser stieg signifikant bei den SBH/y Tieren durch die Gabe von DOCA und Salz verglichen mit den gleichbehandelten SBN/y-DOCA Ratten und den unbeeinflussten salzsensiblen SBH/y Tieren (Abb. 20).

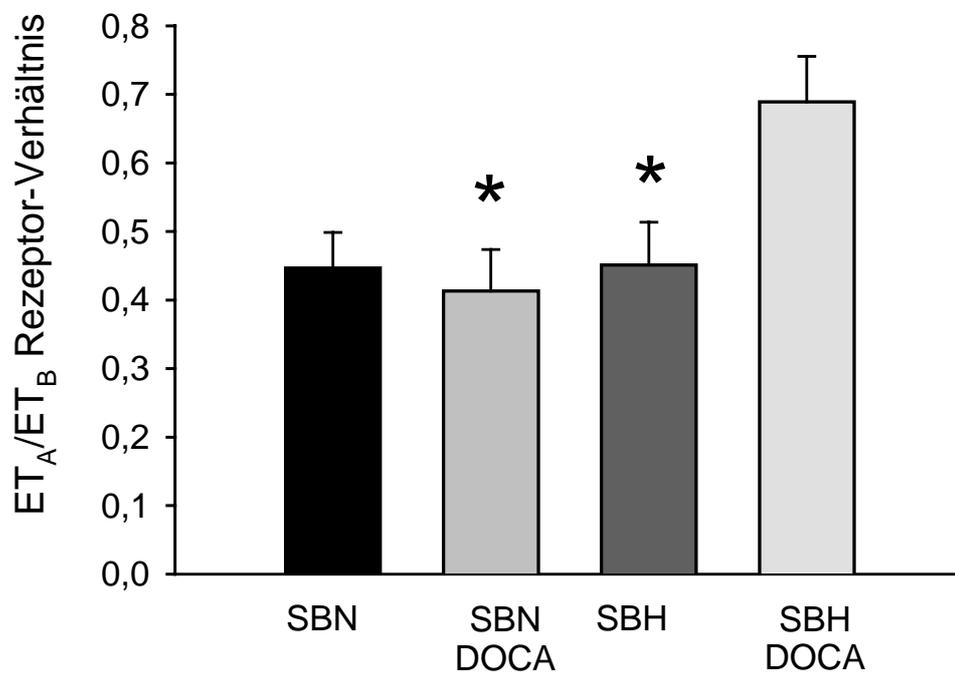


Abbildung 20: ET_A/ET_B Rezeptor-Verhältnis; Desoxycorticosteronacetat (DOCA); $n = 6-7$ in jeder Gruppe; * $P < 0,05$ vs. SBH/y DOCA

3.7.4 Rezeptoraffinität

Unsere Versuchsreihe zeigte keine Affinitätsunterschiede des ET_A-Rezeptors zwischen den beiden Tierlinien oder als Antwort auf eine DOCA-Salz Belastung gemessen anhand des K_d-Wertes.

Unter normalen diätischen Bedingungen wiesen die salzsensiblen SBH/y Tiere eine signifikant höhere ET_B-Rezeptoraffinität auf, als die Ratten der salzresistenten SBN/y Linie. Zwischen den salzbelasteten SBN/y und SBH/y Tieren stellte sich die ET_B-Rezeptoraffinität ähnlich dar, was auf einen signifikanten Anstieg der ET_B-Rezeptoraffinität bei den salzbelasteten SBH/y-DOCA Ratten zurückzuführen ist.

Tabelle 3: Rezeptorbindungsaffinitäten der ET_A- und ET_B-Rezeptoren in den unterschiedlichen experimentellen Gruppen

Experimentelle Gruppen	Endothelin ET _A Rezeptorbindungsaffinität [Kd] (nmol/l)	Endothelin ET _B Rezeptorbindungsaffinität [Kd] (nmol/l)
SBN/y	0,46±0,03	0,61±0,06*
SBN/y-DOCA	0,54±0,12	0,77±0,14
SBH/y	0,39±0,06	0,32±0,04
SBH/y-DOCA	0,53±0,07	0,67±0,06*

Endothelin ET_A und ET_B Rezeptoraffinitäten (Kd) in der Niere, Kd Dissoziationskonstante, Da = Darusentan, selektiver ET_A-Rezeptorantagonist; n = 6-7 in jeder Gruppe; *P < 0,01 vs. SBH/y; Mittelwert ± SEM