

Aus der Klinik für Nephrologie, Hypertensiologie, Transplantations-  
und Intensivmedizin  
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Einfluss der Immunsuppression auf die  
Progredienz der Niereninsuffizienz im Modell der  
5/6 nephrektomierten Ratte

zur Erlangung des akademischen Grades  
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Marcel Haug

aus Berlin

Datum der Promotion: 30.05.2015.....

# Einfluss der Immunsuppression auf die Progredienz der Niereninsuffizienz im Modell der 5/6 nephrektomierten Ratte

Marcel Haug

## Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Abstrakt</b>	<b>4</b>
<b>2</b>	<b>Einleitung</b>	<b>5</b>
2.1	Hypertonie nach Nierentransplantation . . . . .	5
2.2	Chronische Transplantatnephropathie . . . . .	6
2.3	mTOR Inhibitoren . . . . .	6
2.4	Calcineurin-Inhibitoren . . . . .	7
2.5	Ziel der Arbeit . . . . .	7
<b>3</b>	<b>Material</b>	<b>8</b>
3.1	Operationsmaterial . . . . .	8
3.2	Tierhaltung . . . . .	8
3.3	Blutdruckmessung . . . . .	9
3.4	24-Stunden-Urin . . . . .	9
3.5	Blutprobenentnahme und Organpräparation . . . . .	9
3.6	Molekularbiologie . . . . .	9
<b>4</b>	<b>Methoden</b>	<b>10</b>
4.1	Tierexperimentelle Untersuchungen . . . . .	10
4.2	Tierstamm und Haltung . . . . .	10
4.3	Operationstechnik . . . . .	11
4.4	Operationsvorbereitung . . . . .	11
4.5	Technik der 5/6-Nephrektomie . . . . .	11
4.6	Applikation der Immunsuppressiva . . . . .	12
4.7	Blutdruckmessung . . . . .	13
4.8	Uringewinnung und Nierenfunktionsbestimmung . . . . .	13
4.9	Messung der linksventrikulären Funktion . . . . .	14

4.10	Asservation von Blut- und Serumproben . . . . .	14
4.11	Organentnahme . . . . .	15
4.12	Kreatinin-Clearance . . . . .	15
4.13	Gesamt-RNA Extraktion . . . . .	16
4.14	Bioanalyzer . . . . .	16
4.15	cDNA Synthese . . . . .	17
4.16	Polymerase chain reaction (PCR) . . . . .	18
4.17	Touch down PCR . . . . .	18
4.18	Quantitative real-time PCR . . . . .	19
4.18.1	TaqMan- PCR . . . . .	19
4.18.2	SYBR Green . . . . .	20
4.18.3	Oligonukleotide . . . . .	21
4.19	Statistische Analyse . . . . .	21
4.20	Gruppeneinteilung und Studiendesign . . . . .	22
<b>5</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>22</b>
5.1	Medikamentenspiegel . . . . .	22
5.2	Letalität und Gewichtsentwicklung . . . . .	22
5.3	Systolischer Blutdruck . . . . .	24
5.4	Linksventrikuläres Gewicht . . . . .	24
5.5	Rechtsventrikuläres Gewicht . . . . .	25
5.6	Aortengewicht . . . . .	26
5.7	Linksventrikuläre Funktion . . . . .	27
5.7.1	Maximale linksventrikuläre Druckerhöhungsgeschwindigkeit . . . . .	27
5.7.2	Maximale linksventrikuläre Druckabfallsgeschwindigkeit . . . . .	28
5.8	Serumkreatinin und Kreatinin-Clearance . . . . .	29
5.9	Albuminurie und Proteinurie . . . . .	31
5.10	Klinische Chemie . . . . .	32
5.11	COX2 mRNA-Expression . . . . .	33
5.12	VEGF mRNA-Expression . . . . .	34
<b>6</b>	<b>Diskussion</b>	<b>34</b>
6.1	Letalität und Gewichtsentwicklung . . . . .	34
6.2	Systolischer Blutdruck, Herzhypertrophie und vaskuläre Hypertrophie . . . . .	36
6.3	Nierenfunktion . . . . .	38
6.4	COX2 und VEGF Expression . . . . .	42
<b>7</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>43</b>
<b>8</b>	<b>Literatur</b>	<b>43</b>

<b>9 Eidesstattliche Versicherung</b>	<b>50</b>
<b>10 Lebenslauf/Publicationen</b>	<b>52</b>
<b>11 Danksagung</b>	<b>56</b>

# 1 Abstrakt

Everolimus is used as part of immunosuppressive therapy in renal and heart transplanted patients due to its high immunosuppressive potential and lack of nephrotoxicity. Recent studies in a rat model of experimental glomerulonephritis have shown a dose-dependent effect of everolimus on renal function decline as evident from a decrease of creatinine clearance [1]. This study therefore investigated the influence of everolimus and ciclosporin on the progression of renal failure and hypertensive end organ failure in the noninflammatory 5/6 renal ablation rat model of renal failure.

At 12 weeks of age male Wistar rats underwent renal mass reduction (Nx), or Nx and oral treatment with either 10 mg/kg d ciclosporin (CyA-Nx), Everolimus (RAD) microemulsion 0.5 mg/kg d (low-dose-RAD-Nx) or Everolimus (RAD) 2.5 mg/kg d (high-dose-RAD-Nx). After 28 days systolic blood pressure was measured, 24h urinary measurement was performed using metabolic cages and hemodynamic parameters by left heart catheterization obtained. Rats treated with high-dose-RAD showed a high mortality rate (52%), reduced weight gain and reduced creatinine clearance ( $0.26 \pm 0.08$  ml/min \* 100 mgBW) compared to Nx ( $0.37 \pm 0.06$  ml/min \* 100 mgBW) and CyA-Nx ( $0.39 \pm 0.09$  ml/min \* 100 mgBW,  $p \leq 0.05$ , respectively). In contrast, low dose everolimus treatment showed no decrease of creatinine clearance ( $0.31 \pm 0.15$  ml/min \* 100 mgBW).

It is concluded that high dosed treatment with everolimus impairs renal function in a non-inflammatory rat model of renal insufficiency.

Everolimus weist ein hohes immunsuppressives Potential bei geringer Nephrotoxizität auf und wird als Bestandteil einer immunsuppressiven Therapie bei Nieren und Herztransplantierten Patienten eingesetzt. Studien an inflammatorisch bedingten Niereninsuffizienzmodellen zeigten jedoch, dass mit Dosissteigerung von Everolimus eine Verschlechterung der Nierenfunktion eintritt [1]. Ziel der Arbeit ist es, am Rattenmodell der nichtinflammatorischen chronischen Niereninsuffizienz vergleichend den Einfluss der Immunsuppressiva Everolimus und Cyclosporin A auf die Progression des Nierenversagens und hypertensiver Endorganschäden zu untersuchen.

12 Wochen alte männliche Wistar Ratten wurden einer 5/6 Nephrektomie (Nx) unterzogen und anschliessend entweder mit 10 mg/kg d Cyclosporin A (CyA-Nx), Everolimus (RAD) Mikroemulsion 0,5 mg/kg d (low-dose-RAD-Nx) oder Everolimus (RAD) in höherer Dosierung 2,5 mg/kg d (high-dose-RAD-Nx) per os behandelt. Nach 28 Tagen wurden der systemische Blutdruck gemessen, 24-Stunden-Urin in Stoffwechselkäfigen gesammelt, sowie hämodynamische Messungen mittels Linksherzkatheterisierung durchgeführt.

Unter hoher Everolimusdosierung wurde eine erhöhte Mortalität (52%), niedrigere Gewichtszunahme und eine Abnahme der Kreatinin Clearance ( $0,26 \pm 0,08$  ml/min \* 100 mgBW) verglichen mit Nx ( $0,37 \pm 0,06$  ml/min \* 100 mgBW) und CyA-Nx ( $0,39 \pm 0,09$  ml/min \* 100

mgBW,  $p \leq 0,05$ ) beobachtet. In niedrigerer Everolimusdosierung zeigte sich kein Einfluss auf die Kreatinin Clearance ( $0,31 \pm 0,15$  ml/min \* 100 mgBW).

Everolimus führte zu einer dosisabhängigen Verschlechterung der Nierenfunktion im nicht-inflammatorischen Modell der 5/6 nephrektomierten Ratte.

## 2 Einleitung

Ein Großteil der Patienten mit einer essentiellen arteriellen Hypertonie weist eine linksventrikuläre Hypertrophie auf, die konsekutiv zu einer chronischen Herzinsuffizienz mit kardialem Pumpversagen führen kann [2] [3]. Ferner kommt es zu einer mechanischen und funktionellen Schädigung des tonusregulierenden Gefäßendothels, der sogenannten endothelialen Dysfunktion, die in einer Verstärkung der arteriellen Hypertonie resultiert [4]. Die generalisierte hypertensiv bedingte Vaskulopathie kann im weiteren Verlauf bei Schädigung der Koronar- und/ oder Hirngefäße zu Herzrhythmusstörungen, akutem Myokardinfarkt, plötzlichem Herztod oder akutem Hirninfarkt führen [5]. Ein Hauptrisikofaktor des chronischen Nierenversagens, das mit progredienter Abnahme der glomerulären Filtrationsrate, Mikroalbuminurie und Proteinurie einhergeht, ist die hypertensive Nephropathie [6]. Verantwortlich für die Entstehung dieser Endorganschäden zeichnen u.a. eine Aktivierung des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems (RAAS), NO- und Endothelinsystems sowie die Mitbeteiligung genetischer Faktoren, oxidativem Streß und Hyperlipidämie [7]. Des Weiteren kommen inflammatorischen und immunologischen Prozessen und der Interaktion von Wachstumsfaktoren, Zytokinen und Adhäsionsmolekülen als Progressionsfaktoren eine bedeutende Rolle bei der Progression hypertensiver Endorganschäden zu. Histologische Kennzeichen hypertensiver Endorganschäden sind u. a. zelluläre Hypertrophie, leukozytäre Infiltration und Fibrosierung des kardiovaskulären und renalen Gewebes durch eine gesteigerte Produktion von extrazellulärer Matrix [8] [9]. Die Zunahme der Expression von Oberflächenadhäsionsmolekülen und deren Liganden auf inflammatorischen Zellen [10], die Infiltration von immunkompetenten Zellen in die Gefäßwand sowie die vermehrte Freisetzung von Chemokinen, Zytokinen und prokoagulatorischen Faktoren und deren komplexe Interaktion geben Hinweis auf eine große Bedeutung inflammatorischer und immunologischer Prozesse für die Genese der hypertensiven Endorganschädigung [11].

### 2.1 Hypertonie nach Nierentransplantation

Nach einer Nierentransplantation kommt es bei bis zu 60 bis 80 Prozent der Empfänger zur Entwicklung einer arteriellen Hypertonie und ein ungenügend eingestellter Blutdruck wird häufig beobachtet [12] [13]. In einer monozentrischen Studie fanden Paoletti et al. nur 5 Prozent der Patienten nach Nierentransplantation normotensiv im Rahmen ambulanter Blutdruckmessungen [14]. Ein erhöhter Blut- und Pulsdruck kann in der Population der Patienten

mit Zustand nach Nierentransplantation das Transplantatüberleben negativ beeinflussen. Als Risikofaktoren für eine arterielle Hypertonie nach Nierentransplantation konnten neben dem chronischen Transplantatversagen, der Kadaverspende, dem Körpergewicht, genetischen Faktoren, einer Nierenarterienstenose und dem Vorhandensein von nativen Nieren auch die immunsuppressive medikamentöse Therapie mit Calcineurininhibitoren und Glucocorticoiden identifiziert werden [15] [16] [17].

In tierexperimentellen Studien konnte gezeigt werden, dass Mycophenolat-Mofetil (MMF) in die Pathogenese der hypertensiven Endorganschädigung inhibierend eingreift und klinische Zeichen des chronischen Nierenversagens wie Proteinurie und Albuminurie reduzieren kann [18]. Ob eventuell auch eine Reduktion der hypertensiven Vaskulopathie und der kardialen Schädigung durch einen immunmodulatorischen Ansatz erzielt werden kann, ist bislang nicht geklärt.

Die Frage, ob neben der Therapie mit Hemmern des RAAS auch immunsuppressive und antiinflammatorische Substanzen durch Inhibition immunologischer und inflammatorischer Prozesse die Progression von hypertensiven Endorganschädigungen und somit die Morbidität und Mortalität bei arterieller Hypertonie beeinflussen können, ist bislang nicht beantwortet. Des Weiteren blieb bisher die Fragestellung offen, ob und gegebenenfalls welchen unterschiedlichen Einfluß die nach Nierentransplantation angewandten Immunsuppressiva auf die Progredienz der chronischen Transplantatnephropathie ausüben.

## 2.2 Chronische Transplantatnephropathie

Ein zentrales Thema in der Nephrologie ist die sich nach Monaten bis Jahren nach Nierentransplantation manifestierende sog. chronische Transplantatnephropathie, die durch progredienten Kreatininanstieg, Proteinurie ( $< 3 \text{ g/d}$ ) und arterielle Hypertonie gekennzeichnet ist. Ursächlich hierfür scheinen sowohl immunologische als auch nichtimmunologische Prozesse zu sein: Freisetzung von Wachstumsfaktoren wie TGF- $\beta$ 1 und PDGF aus Makrophagen und Thrombozyten mit konsekutiver zellulärer Proliferation führen zur Zunahme von extrazellulärer Matrix und Fibrose des Transplantats. Weitere Schädigungsmechanismen stellen sekundäre Veränderungen durch Hypertonus und Hyperlipidämie sowie atheromatöse Veränderungen des Spenderorgans dar [19].

## 2.3 mTOR Inhibitoren

Rapamycin ist ein Makrolidantibiotikum, das aus dem Pilz *Streptomyces hygroscopicus* isoliert werden kann. Rapamycin bildet einen intrazellulären Komplex mit Immunophilinen insbesondere mit FKBP12 und bindet gleichzeitig Rapamycineffektorproteine (FRAP, RAFT) und inhibiert so die Phosphatidylinositol-Kinaseaktivität [20]. Everolimus ist ein Rapamycinanalogon, welches wie Rapamycin seine immunsuppressive Wirkung durch Bindung an das Zielprotein TOR ausübt, wodurch spezifische Phosphorylierungskaskaden blockiert und

die Wirkung von Wachstumsfaktoren und Zytokinen auf B- und T-Zellen gehemmt werden. Ferner ist für die Substanz eine generell antiproliferative Wirkung beschrieben. Außerdem wird für die Substanzen eine antiproliferative Wirkung auf Muskelzellen postuliert, wodurch auch hier Fibrosebildung unterdrückt werden könnte [21] [22].

## 2.4 Calcineurin-Inhibitoren

Ciclosporin A verhindert als Calcineurin-Inhibitor die IL-2-Produktion, die Proliferation aktivierter T-Zellen und beeinflusst die Interaktion von Wachstumsfaktoren und Zytokinen. Ciclosporin A erhöht den systemischen und renalen Widerstand. Der zugrunde liegende Mechanismus ist bislang nicht vollständig aufgedeckt, wobei eine vermehrte Ausschüttung vasokonstriktorischer Substanzen wie Endothelin eine Rolle zu spielen scheint [23].

## 2.5 Ziel der Arbeit

In die Entstehung der hypertensiven Endorganschäden sind unterschiedlichste Pathomechanismen involviert. Neben der Aktivierung des RAAS, NO- und Endothelinsystems sowie der Mitbeteiligung genetischer Faktoren, oxidativem Streß und Hyperlipidämie scheinen hierbei insbesondere inflammatorische und immunologische Prozesse mit enger Interaktion von Wachstumsfaktoren, Zytokinen und Adhäsionsmolekülen als Progressionsfaktoren eine bedeutende Rolle zu spielen. Zur Untersuchung dieser komplexen Pathomechanismen ist es von entscheidender Bedeutung Tiermodelle zu verwenden, die klinische Charakteristika der arteriellen Hypertonie wie chronisch-progressives Nierenversagen, linksventrikuläre Hypertrophie sowie hypertensive Vaskulopathie in sich vereinen. Daher wurde in der vorliegenden Arbeit das 5/6 Nephrektomiemodell der Ratte verwendet.

Everolimus wird mit zunehmender Bedeutung als Bestandteil einer Tripeltheapie mit dem Argument der Verringerung nephrotoxischer Cyclosporinwirkung eingesetzt. Studien an inflammatorisch bedingten Niereninsuffizienzmodellen zeigen jedoch, dass mit Dosissteigerung von Everolimus eine Verschlechterung der Nierenfunktion eintritt [1]. Ob diese Wirkung auch bei nichtinflammatorisch bedingter Nierenschädigung besteht, ist bislang ungeklärt. Zusammenfassend besteht das Ziel der vorliegenden Untersuchungen darin, am chronisch niereninsuffizienten Rattenmodell vergleichend zu untersuchen, ob und in welchem Ausmaß eine immunmodulierende Behandlung, durch Hemmung inflammatorischer und immunologischer Pathomechanismen die Progression von hypertensiv bedingten Endorganschäden beeinflussen kann. Da die Entstehung der chronischen Transplantatnephropathie ebenfalls durch inflammatorische und immunologische Faktoren bedingt ist, könnten die Ergebnisse der Untersuchungen Hinweise auf die immunsuppressive Therapie nierentransplantierter Patienten geben und somit einen therapeutischen Ansatz für die Prävention des Auftretens der chronischen Transplantatnephropathie bieten. Außerdem werden immunsuppressive Therapieansätze bei verschiedensten Krankheitsbildern verfolgt, so dass bei gleichzeitig

bestehender Nierenschädigung eine Abschätzung der Auswirkungen auf die Nierenfunktion wünschenswert ist.

Im Detail werden folgende Parameter untersucht:

- Kreatinin-Clearance als Parameter der Nierenfunktion
- Höhe des systolischen Blutdrucks
- Ausmaß der links- und rechtsventrikulären Hypertrophie
- Renale mRNA-Expression der renalen Cyclooxygenase-2 (COX2)
- Renale mRNA-Expression des Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)

### **3 Material**

- Ketamin 10 % (Ketanest®)
- Xylazin 2% (Rompun®)
- Braunol®-Lösung (Firma Braun)
- Injektionsbesteck zur Intraperitonealnarkose
- Buprenorphin (Temgesic®)

#### **3.1 Operationsmaterial**

- Stumpfe Haken
- Ethicon Vicryl 6/0 USP, Metric 1 (Ligatur)
- Dexon Bicolor II, 3/0 USP, Metric 2 (Muskel-/Hautnaht)
- Panthenol-Augensalbe

#### **3.2 Tierhaltung**

- Gemeinschaftskäfige Makrolon Typ 4
- Leitungswasser
- Weichholzgranulat
- Altromin®-Tierfutter (Altromin Gmbh Lage/Lippe)

### **3.3 Blutdruckmessung**

- Wärmekammer
- Computergestützter Schwanzpletysmograph (Firma TSE, Bad Homburg)
- Restrainer

### **3.4 24-Stunden-Urin**

- Stoffwechselkäfige

### **3.5 Blutprobenentnahme und Organpräparation**

- Eppendorf - Pipettenstandardtipps 1000 $\mu$ l, 500 $\mu$ l Eppendorf AG Hamburg
- Eppendorf - Gefäße Safe - Lock 0,5ml, 1,5ml
- Kühlzentrifuge Eppendorf 5417 R, Eppendorf AG Hamburg
- Glasgeräte (Firma Braun KG, Melsungen)
- Analysenwaage (Sartorius AG)
- Flüssiger Stickstoff
- Methacarn (60% Methanol, 30% Chloroform, 10% Essigsäure)
- Ethanol 75

### **3.6 Molekularbiologie**

- NucleoSpin® RNA II Total RNA Isolation Kit (Macherey-Nagel Düren)
- First Strand cDNA Synthesis Kit, MBI Fermentas
- Bioanalyzer 2100 Firma Agilent
- Homogenisator Ultra Turrax T25, Jahnke und Kunkel
- Kühlzentrifuge Eppendorf 5417 R, Eppendorf AG
- Photometer, Shimadzu
- Gelkammer (90 Volt) Biorad
- Fotogerät und -drucker für Gele, SONY
- ThermoCycler PTC-200 und PTC-100, MJ Research Peltier

- Taqman-Apparat ABI-Prism 7000 STS, Applied Biosystems, Darmstadt
- Pipette Reference 10-100  $\mu$ l, 100-1000  $\mu$ l, Eppendorf
- Mikrozentrifuge II, The Griffin Group, Inc. OHIO, USA
- Respirator, Rodent Ventilator 7025, UGO Basile
- Präzisionswaage, Satorius Laboratory
- Glasgefäße mit Schraubverschluss 20ml, Packard, Econoglass

## 4 Methoden

### 4.1 Tierexperimentelle Untersuchungen

Die tierexperimentellen Untersuchungen wurden über einen Zeitraum von insgesamt acht Monaten durchgeführt. Die Eingriffe erfolgten unter Einhaltung des deutschen Tierschutzgesetzes und standen im Einklang mit den Richtlinien für Tierversuche des Instituts für Klinische Pharmakologie, Charité Universitätsmedizin Berlin, Campus Benjamin Franklin. Unter der Genehmigungsnummer G 0054/05 wurden die beschriebenen Tierversuche durch das Landesamt für Arbeitsschutz, Gesundheitsschutz und technische Sicherheit Berlin genehmigt. Die Eingriffe erfolgten sämtlich nach dem in den Richtlinien festgelegten methodischen Vorgehen. Je nach Gruppenzugehörigkeit wurden die Tiere dem entsprechenden gruppenspezifischen operativen wie postoperativen Prozedere unterzogen.

### 4.2 Tierstamm und Haltung

Für die Studie wurden ausschließlich gesunde männliche Wistar Ratten im Alter von zwei Monaten verwendet. Die Tiere wurden über die Charles River Deutschland GmbH bezogen und in der Forschungseinrichtung für experimentelle Medizin der FU Berlin (FEM) gehalten und versorgt. Der operative Eingriff sowie die Blutdruckmessung und die Sammlung des 24-Stunden-Urins wurden in speziellen Räumen des FEM durchgeführt. Die Tiere wurden über einen Zeitraum von 28 Tage in Gruppen bis zu vier Tieren pro Käfig gehalten und engmaschig auf Gewichtszunahme, äußerlichen Eindruck und Verhaltensauffälligkeiten kontrolliert. Beim Auftreten von neurologischen Symptomen wie Krämpfen, starkem Gewichtsverlust, Atemnot, Apathie oder anderen Anzeichen starker Schmerzen wurden die betroffenen Tiere vorzeitig getötet. Die Tiere erhielten über den gesamten Zeitraum des Experimentes Zugang zu Futter und Leitungswasser ad libitum. In den Tierställen herrschten konstante Bedingungen. Die Temperatur lag bei 22° C, die Luftfeuchtigkeit lag bei 50%. Über automatisierte Lichtschalter wurde ein 12-stündiger Tag-Nacht-Rhythmus geregelt; die Temperatur betrug konstant 22 °C. Die abschließende Linksherzkatheteruntersuchung sowie die Organentnahme wurde in

den Räumen der klinischen Pharmakologie im Universitätsklinikum Benjamin Franklin der FU Berlin durchgeführt. Zu diesem Zweck wurden die Tiere in ihren Käfigen aus dem FEM in die Klinik überführt und über einen Zeitraum von 24 Stunden zur Eingewöhnung im Tierstall belassen, bevor die abschließenden Untersuchungen durchgeführt wurden.

### **4.3 Operationstechnik**

Für den gesamten Versuch wurden lediglich Tiere in der 12. bis 13. Lebenswoche verwendet, deren Gewicht sich zum Zeitpunkt der Operation zwischen 300 und 350g bewegte. Die Operation wurde unter semisterilen Bedingungen durchgeführt. Operationsbesteck wie Operationsfeld wurden nach jeder Operation gewaschen und mit alkoholischer Lösung desinfiziert.

### **4.4 Operationsvorbereitung**

Die Tiere wurden zur Operationsvorbereitung in den Vorbereitungsraum verbracht, aus den Gemeinschaftskäfigen in Einzelkäfige umgesetzt, gewogen und entsprechend ihrem individuellen Gewicht narkotisiert. Die Anästhesie erfolgte durch intraperitoneale Injektion von Ketanest S 25 in einer Dosis von 0,172mg/100g Körpergewicht sowie Xylazin 2% in einer Dosis von 0,065mg/100g Körpergewicht. Im Anschluss an die Injektion wurden die Tiere in die Einzelkäfige zurückgesetzt und bis zum Einsetzen der Narkose beobachtet. In Einzelfällen mussten Anästhetika in niedriger Dosierung nachappliziert werden. Nach dem Eintritt der Narkose wurde das Operationsfeld rasiert und panthenolhaltige Augensalbe zum Schutz vor Austrocknung der Augen appliziert. Anschließend wurden die Tiere im Operationsaal atraumatisch in Rückenlage auf der Operationsunterlage fixiert und der Operationsbereich mit jodhaltiger Desinfektionslösung desinfiziert. Mit Hilfe einer anatomischen Pinzette wurde die Zunge manuell extrahiert, um eine ausreichende Spontanatmung zu gewährleisten und eine Verlegung der oberen Atemwege im Verlauf der Operation zu verhindern.

### **4.5 Technik der 5/6-Nephrektomie**

Voraussetzung für den Beginn der Operation war eine adäquate Narkosetiefe, welche durch Setzen von Schmerzreifen mittels einer chirurgischen Pinzette in die unteren Pfoten bestimmt werden konnte. Bei adäquater Narkosetiefe wurde eine mediane Laparotomie mit Spaltung von Haut, Muskulatur, Faszie und Peritoneum durchgeführt, um freien Zugang zur Bauchhöhle zu erhalten. Magen, Darm, Leber und Milz konnten durch Einsatz von Watte-Teststäbchen nach lateral und cranial verdrängt und mit stumpfen Haken fixiert werden. Somit wurde eine gute Übersicht über die zunächst zu präparierende linke Niere gewährleistet. Nach Präparation des linken Nierenhilums durch Inzision des Peritoneum parietale und Entfernung des peritonealen Fettgewebes wurde der Gefäßverlauf beurteilt und je nach Situation ein bis zwei Seitenäste der Arteria renalis sinistra ligiert. Anschließend wurde die Niere ma-

kroskopisch bewertet. Anhand der bläulich lividen Verfärbung des Nierenparenchyms mit Ausbildung einer Demarkationslinie war es möglich, ischämisches Nierengewebe von noch intaktem zu differenzieren. Auf diese Weise konnte, durch gezielte Identifikation und konsekutive Ligatur einzelner arterieller Seitenäste die Perfusion von letztlich ca. 1/2 bis 2/3 der linken Niere dauerhaft unterbunden werden. Nach Kontrolle der Narkosetiefe wurde mit der Präparation der rechten Niere begonnen. Hierfür wurden zunächst abermals benachbarte Organe in der oben beschriebenen Weise mit Wattestäbchen und stumpfem Haken verdrängt. Die rechte Niere wurde unter Schonung der Nebenniere, der Leber und des rechten Nervus femoralis stumpf aus ihrem Lager herauspräpariert. Nach ihrer Freilegung konnte im nächsten Schritt der gesamte Gefäßstamm mitsamt Ureter mittels Ligatur unterbunden werden. Zur Vermeidung von Nahtinsuffizienzen und der daraus resultierenden Gefahr von letalen Nachblutungen wurde die erste Ligatur durch eine zweite, weiter medial in Richtung Aorta, verstärkt. Dies geschah unter Verwendung einer gebogenen Pinzette sowie einer nichtresorbierbaren Handseide der Stärke 0. Zuletzt wurde die Niere mit einer stumpfen Pinzette gegriffen, Gefäßstamm und Ureter mit einer Präparierschere weit distal durchtrennt und das Organ auf diese Weise komplett entfernt. Nach Kontrolle des Gefäßstumpfes auf Nahtinsuffizienzen war die operative Reduktion des Nierengewebes um 5/6 abgeschlossen. Nach nochmaliger Kontrolle des Operationserfolges auf der Gegenseite wurde mit dem Verschluss der Bauchhöhle begonnen. Der Verschluss von Peritoneum und Muskelfaszie erfolgte durch fortlaufende Naht mit resorbierbarem Nahtmaterial. Die Hautwunde wurde mittels fortlaufender Naht intrakutan vernäht, um eine Eröffnung durch das Tier zu vermeiden. Zuletzt wurde der einzig zugängliche Knoten der Naht mittels eines Hautlappens gedeckt. Die Eröffnung der Wunde durch das Tier selbst oder die Artgenossen konnte auf diese Weise in allen Fällen verhindert werden. Abschließend wurde die Operationswunde mit Braunol desinfiziert, das Tier in einen Käfig verbracht, der durch eine Heizdecke gewärmt wurde und bis zum Abklingen der Anästhesie beobachtet. Zur postoperativen Analgesie wurde Buprenorphin (Temgesic®) 0,04 mg/kg Körpergewicht in 0,9% Natriumchloridlösung verdünnt und subkutan appliziert. Postoperativ wurden die Tiere erneut in Gemeinschaftskäfigen bis zu vier Individuen gehalten. Die Analgesie der Tiere wurde für die ersten zwei postoperativen Tage bei engmaschiger klinischer Beobachtung fortgeführt.

## **4.6 Applikation der Immunsuppressiva**

Alle Immunsuppressiva wurden ab dem ersten postoperativen Tag täglich durch das geschulte Personal des FEM oral per Gavage verabreicht. Cyclosporin A (Neoral) wurde in einer Dosis von 10 mg/kg Körpergewicht, Everolimus (Certican) als Microemulsionlösung in den Dosen 0,5 mg/kg Körpergewicht und 2,5 mg/kg Körpergewicht gegeben. Die Everolimus Microemulsionlösung wurde hierfür durch die Tierpfleger des FEM nach Einweisung täglich neu hergestellt. Es wurden Dosierungen gewählt, die im Nierentransplantationsmodell der Ratte

alleine und in einem synergistischen Regime mit Cyclosporin A verwendet werden können, um eine chronische Abstossungsreaktion nach Nierentransplantation zu verhindern [24]. Der Cyclosporinspiegel lag exemplarisch gemessen mit  $90,3 \mu\text{g/l}$  im therapeutischen Bereich. Des Weiteren wurde eine im Tiermodell gängige Cyclosporindosis gewählt.

## 4.7 Blutdruckmessung

Die systolische Blutdruckmessung wurde in der vierten postoperativen Woche mittels nichtinvasiver Tail-cuff-Methode am wachen Tier durchgeführt. Hierfür wurden die Tiere in metallenen Röhren (Restrainern) fixiert, die in eine auf  $40^\circ \text{C}$  temperierte Kammer gelegt wurden. Nach einer ca. 20 minütigen Eingewöhnungsphase wurde der systolische arterielle Blutdruck der Schwanzarterie durch eine Blutdruckmanschette und einen Transducer bestimmt. Hierzu wurde initial der Blutfluss in der Schwanzarterie durch Erhöhung des Manschettendruckes unterbunden, um daraufhin durch langsames phasenweises Absenken des Manschettendruckes eine Durchblutung wieder zu ermöglichen. Mittels des nachgeschalteten Transducers konnte das Sistieren und erneute Auftreten des arteriellen Flusses digitalisiert und per Computer dem jeweils herrschenden Druck in der Manschette korreliert werden. Aus dem angezeigten Graphen des Druckes über den Blutfluss wurde der minimal benötigte Druck zur Unterbindung der Durchblutung sowohl beim Anheben als auch beim Absenken des Manschettendruckes bestimmt und die beiden Werte gemittelt. Zur Gewöhnung an die Bedingungen der Messung und zur Minimierung des Effektes von Streuwerten wurden in allen Fällen zunächst mehrere Probeversuche unternommen. Zudem wurde der Blutdruck mindestens dreimal an zwei aufeinander folgenden Tagen zur selben Tageszeit von denselben Personen bestimmt. Die gewonnenen Daten wurden im Computer gespeichert und anschließend pro Individuum gemittelt.

## 4.8 Uringewinnung und Nierenfunktionsbestimmung

Zur Sammlung des Urins über 24 Stunden wurden die Tiere bei freiem Zugang zu Futter und Trinkwasser einzeln in Stoffwechsellkäfige gesetzt, deren spezieller Aufbau eine getrennte Sammlung von Urin und Kot gewährleistet. Nach einer Adaptationszeit von 12 Stunden wurde der bis dahin gesammelte Urin verworfen. Der nach weiteren 24 Stunden gesammelte Urin wurde dekantiert und das Urinvolumen durch Auswiegen bestimmt, wobei von einem Gewicht von ca.  $1\text{g/ml}$  ausgegangen wurde. Für die laborchemische Analyse wurden nach sorgfältigem Durchmischen zwei Aliquots von  $1 \text{ml}$  für die auswärtige Bestimmung der Elektrolyt-, Kreatinin- und Harnstoffkonzentrationen durch das Labor 28 und die Albumin und Gesamtproteinkonzentrationen im Institut der klinischen Pharmakologie pipettiert und bei  $-80^\circ \text{C}$  gelagert. Der restliche Urin wurde nach Dekantieren in einem Szintillationsgefäß aus Kunststoff bei  $-20^\circ \text{C}$  aufbewahrt. Am Ende der vierten Woche wurden alle Tiere einzeln in einen speziellen Stoffwechsellkäfig überführt, welcher bei freiem Zugang zu Futter und

Wasser die Asservation des 24-Stunden-Urins ermöglichte. Der Auffangmechanismus dieser Käfige beruht auf der Tatsache, dass ihr Boden vollständig aus einem Metallgitter besteht, welches sowohl von Kot als auch von Urin passiert werden kann. Flüssigkeiten fließen hierbei aufgrund ihrer Oberflächenspannung an der Wand eines an der Unterseite des Käfigs angeschlossenen, sich nach unten verjüngenden Kunststoffkegels entlang, welcher sie von festen Exkrementen trennt. In einem Kunststoffgefäß an der Spitze des Kegels werden diese flüssigen Exkremente aufgefangen, gesammelt und einer weiteren Untersuchung zugänglich gemacht. Die Bestimmung der Protein- und Albuminkonzentrationen der individuellen Proben erfolgte labortechnisch in den Räumen des Institutes für klinische Pharmakologie, Charité Universitätsmedizin Berlin, Campus Benjamin Franklin, Charité - Berlin in Berlin-Steglitz.

#### **4.9 Messung der linksventrikulären Funktion**

Nach 28 Tagen wurden die Tiere gewogen und nach demselben Schema wie bereits in 4.4 beschrieben anästhesiert und für die Herzkatheteruntersuchung anhand der open-chest Methode vorbereitet. Nach Kalibrierung des Herzkathetersystems konnte mit dem Eingriff begonnen werden. Es wurde ein medianer Schnitt cranial der fossa infraclavicularis bis zum Unterkiefer gesetzt und nach Inzision der Halsfaszie der M. sternohyoideus mit stumpfen Haken fixiert. Nach atraumatischer Präparation unter besonderer Schonung der Arteria carotis und des Nervus vagus und Darstellung der Trachea, wurde unterhalb der Schilddrüse über einen Froschschnitt eine Braunüle der Stärke 20 Gauge eingeführt. Hierüber erfolgte eine kontinuierliche Beatmung mit einer Frequenz von 70 Atemzügen in der Minute und einem Volumen von 7 ml, um der Kollabierung beider Lungen durch die nachfolgende Thorakotomie entgegenzuwirken. Die Thorakotomie erfolgte über einen Schnitt lateral des Sternums im 5. Interkostalraum, der durch einen Rippenspreizer geweitet wurde. Die Herzspitze wurde mit einer anatomischen Pinzette gegriffen und der linke Ventrikel unter Sicht mit einer Braunüle der Stärke 20 Gauge punktiert. Über diese Braunüle wurde ein Miliar-Katheter der Stärke 2 French in den linken Ventrikel vorgeschoben und es wurde mit der Aufzeichnung der linksventrikulären Drücke über einen Zeitraum von ca. 10 Minuten begonnen.

#### **4.10 Asservation von Blut- und Serumproben**

Zum Ende der vierten postoperativen Woche wurden die Tiere gewogen und ihr Allgemeinzustand beurteilt. Für die Narkosevorbereitung wurden die Ratten wiederum in Einzelkäfige verbracht. Durch intraperitoneale Injektion von Ketamin S25 ( 0,174 mg / 100g KG ) und Xylazin 2% ( 0,065 mg / 100 g KG ) wurden die Tiere narkotisiert. Nach einer Herzkatheteruntersuchung trat der Tod der Tiere durch Ausbluten über eine Verweilkanüle ein. Das aufgefangene Blut wurde 20 min bei Raumtemperatur gelagert und anschließend für 15 min bei 8000 U / min und 4°C zentrifugiert. Das Serum wurde pipettiert und in 2 ml Eppendorfröhrchen in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die anschließende Lagerung

erfolgte bei - 80 °C. Aus diesen Proben wurde später die Konzentration von Kreatinin und anderer Serumparameter ermittelt. Durchgeführt wurden diese Arbeiten vom Labor 28 in Berlin-Wilmersdorf.

#### 4.11 Organentnahme

Unmittelbar nach der Blutentnahme wurden Bauch- und Brusthöhle mittels Medianschnitt eröffnet. Herz, Niere und Leber wurden makroskopisch begutachtet. Das Herz wurde entnommen und nach Abtrennung der großen Gefäße sowie Entfernung von Blutresten gewogen. Der rechte Ventrikel wurde septumnah vom linken Ventrikel abgetrennt und in einem 2 ml Eppendorfröhrchen in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Der linke Ventrikel wurde erneut gewogen. Die Herzspitze wurde abgetrennt und ebenfalls schockgefroren. Niere, Nebennieren, Lunge, Leber und Aorta wurden auf gleiche Weise präpariert sowie in Anteilen in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Rattenkadaver wurden separat gesammelt und durch die Tierkörperbeseitigung des Hauses entsorgt. Sämtliche in flüssigem Stickstoff schockgefrorene Organproben wurden bei - 80 °C in den Räumen der Klinischen Pharmakologie, Charité Universitätsmedizin Berlin, Campus Benjamin Franklin, Charité - Berlin für die Verwendung in weiterführenden Studien eingelagert.

#### 4.12 Kreatinin-Clearance

Die Clearance-Leistung des gesamten Nierengewebes eines Organismus ist definiert als dasjenige Plasmavolumen, welches innerhalb einer Zeiteinheit durch Harnbildung von einer bestimmten Substanz gereinigt wird. Sie wird üblicherweise in der Einheit [ml/min] ausgedrückt. Zur Einschätzung der Nierenfunktion in den drei zu analysierenden Tiergruppen kam in der vorliegenden Studie die auch im Rahmen von klinischen Fragestellungen gebräuchliche Bestimmung der Kreatinin-Clearance zur Anwendung. Hierbei gilt die Formel:

	C : Kreatinin-clearance in ml/min
	U : Kreatininkonzentration im 24h-Urin (mg/dl)
$C = \frac{U \times UV}{S \times t}$	UV : Uringesamtvolumen in 24h (ml)
	S : Kreatininkonzentration im Serum (mg/dl)
	t : Zeit (min)

Abbildung 1: Kreatinin-Clearance

Die Bestimmung der Kreatinin-Clearance eignet sich als Annäherung der glomerulären Fil-

trationsrate, da Kreatinin im Glomerulus frei filtriert wird und keine nennenswerte tubuläre Rückresorption erfolgt. Kreatinin fällt als Endprodukt des Muskelstoffwechsels in physiologisch konstanter Menge an, wobei von einem annähernd konstanten Verhältnis zwischen Produktion und Ausscheidung ausgegangen werden kann. Die Tatsache, dass Kreatinin zu einem geringen Anteil im renalen Tubulussystem aktiv sezerniert wird, führt dazu, dass die effektive Filtrationsleistung des Nierenparenchyms (in allen Tiergruppen auf gleiche Weise) in geringem Maße überschätzt wird.

### 4.13 Gesamt-RNA Extraktion

Die Extraktion der Gesamt-RNA aus dem Nierenkortexgewebe erfolgte mit dem NucleoSpinKit® (Qiagen) nach Anleitung des Herstellers. Das Prinzip dieses Verfahrens beruht auf der reversiblen Bindung von Nucleinsäuren an Silikate in Gegenwart chaotroper Salze. Nach Homogenisierung des Gewebes erfolgte die Lyse der Zellen durch Inkubation in dem chaotropen Salz Guanidinisothiocyanatlösung (GTC), welches eine sehr effektive Denaturierung und Inaktivierung von Proteinen und somit auch RNasen bewirkt. Durch Zugabe von  $\beta$ -Mercaptoethanol konnte die Inaktivierung der RNasen noch verstärkt werden. Anschließend wurden die Lysate filtriert und durch Zugabe von Alkohol und durch Absenken des pH Wertes Bindebedingungen eingestellt, unter denen einzelsträngige Nucleinsäuren quantitativ an eine Silica-Matrix binden. Durch das Einsetzen eines Puffers mit niedrigem Salzgehalt kommt es anschließend zu einer Rehydratisierung und einem Ablösen der Nucleinsäuren von der Matrix, welche nach Einsatz von DNAsen zur Verdauung genomischer DNA mit RNA-freiem Wasser eluiert und bei  $-80^{\circ}$  C vorübergehend gelagert wurden.

### 4.14 Bioanalyser

Die Qualitätskontrolle und die Messung der Konzentration der extrahierten Gesamt-RNA wurde mit dem Agilent 2100 Bioanalyser durchgeführt. Hierbei handelt es sich um ein Gerät, welches auf der LabChip™ Technologie basierend eine automatisierte Elektrophorese auf einer Mikrofluid-Plattform bereitstellt. Die Längenseparation, die Aufnahme und Archivierung des Gelbildes und seine Auswertung werden hierbei, zu einem Prozeß zusammengefasst, digitalisiert. Des Weiteren kann anhand der RNA integrity number (RIN) die Integrität der Gesamt-RNA geschätzt und somit die Qualität der RNA Probe beurteilt werden (Beispiel siehe Abbildung 2).

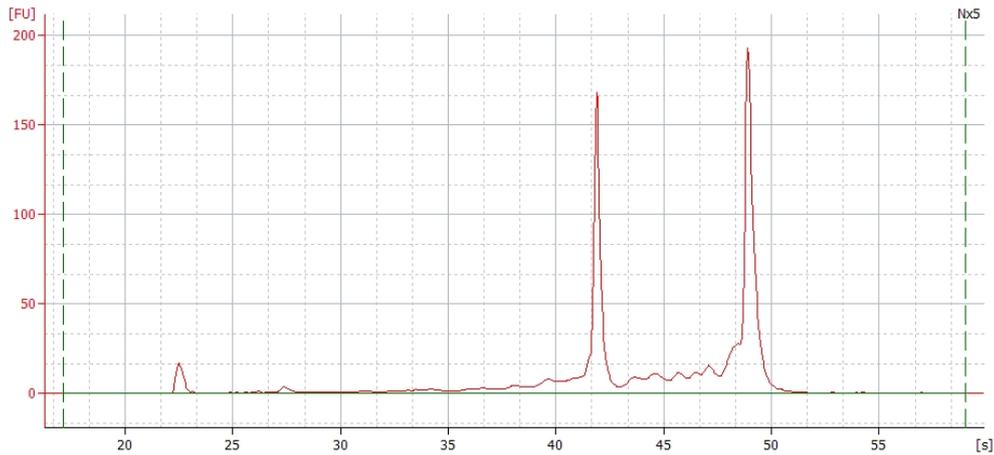


Abbildung 2: Elektropherogramm Probe Nx 5

## 4.15 cDNA Synthese

Die aus dem Nierengewebe extrahierte Gesamt- RNA musste, um eine quantitative real-time PCR durchführen zu können und zur weiteren Lagerung in stabilere cDNA umgeschrieben werden. Hierfür wurde der First Strand cDNA Synthesis Kit und das Protokoll der Firma MBI Fermentas verwendet. Aus der extrahierten Gesamt-RNA wird bei dieser Technik durch das Enzym Reverse Transkriptase aus dem *Moloney murine leukemia virus* (MMLV-RT) einer RNA-abhängigen DNA-Polymerase *complementary* DNA (cDNA) synthetisiert. Als Primer dieser Reaktion dienten random hexamer Primer, die durch zufällige Hybridisierung an der RNA die Vollständigkeit der in der RNA kodierten Information in der cDNA sicherstellten. Für diese Reaktion wurde in einem ersten Schritt ein Ansatz mit einem Gesamtvolumen von  $11\mu\text{l}$  aus  $2\mu\text{g}$  der jeweiligen RNA, deren entsprechendes Volumen anhand der mit dem Bioanalyser gemessenen RNA-Konzentrationen berechnet wurde,  $1\mu\text{l}$  Random Hexamer Primer und DEPC-Wasser erstellt. Die Reverse Transkription erfolgte in einem zweiten Schritt, wobei dem Ansatz  $4\mu\text{l}$  Reaktions Puffer,  $1\mu\text{l}$  RNase-Inhibitor,  $2\mu\text{l}$  dNTP-Mix sowie  $2\mu\text{l}$  MMLV-RT hinzugefügt wurden (Schema siehe Abbildung 3).

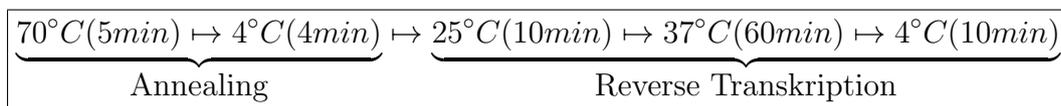


Abbildung 3: cDNA Synthese

## 4.16 Polymerase chain reaction (PCR)

Mit Hilfe der polymerase chain reaction (PCR) ist es möglich definierte DNA Abschnitte spezifisch zu vervielfältigen. Hierfür wurden PCR-Ansätze mit  $50\mu\text{l}$  Volumen nach folgendem Schema erstellt:

- $5\mu\text{l}$  10x Reaction Buffer
- $1\mu\text{l}$  forward Primer ( $10\mu\text{M}$ )
- $1\mu\text{l}$  reverse Primer ( $10\mu\text{M}$ )
- $5\mu\text{l}$  dNTP Mix ( $2,5\text{mM}$ )
- $1,5\mu\text{l}$   $\text{MgCl}_2$  ( $50\text{mM}$ )
- $35\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}$
- $0,5\mu\text{l}$  Taq- Polymerase
- $1\mu\text{l}$  Template

Die PCR lässt sich in die Phasen Denaturierung, Annealing und Elongation einteilen. Während der Denaturierungsphase wird die Temperatur auf  $95^\circ\text{C}$  erhöht, wodurch die Wasserstoffbrücken zwischen den Basenpaaren aufgebrochen werden. An die nun einzelsträngige DNA können sich im nächsten Schritt, der Annealingphase, bei ca.  $55^\circ\text{C}$  (bzw. der Schmelztemperatur der Primer ( $T_m$ )), die sequenzspezifischen Oligonukleotide, forward und reverse Primer, anlagern. In der Phase der Elongation wird bei  $72^\circ\text{C}$  durch das Enzym Taqpolymerase die von den Primern markierte Sequenz amplifiziert.

## 4.17 Touch down PCR

Alle PCR wurden mit der touch down-PCR durchgeführt, bei der die Spezifität der Primerbindung durch zyklusweise Annäherung der Annealing-Temperatur an die zu erwartende Schmelztemperatur des Primers erhöht wird. Von einer anfänglich hohen Annealing-Temperatur von  $65^\circ\text{C}$ , bei der wenige dafür aber hoch spezifische Amplifikate erzeugt werden, wird die Annealing-Temperatur über 30 Zyklen jeweils um  $0,5^\circ\text{C}$  gesenkt, so dass sie am Ende unter der Schmelztemperatur der Primer liegt. Abschließend wird über 10 Zyklen mit einer Annealing-Temperatur von  $55^\circ\text{C}$  die Quantität der PCR erhöht (Schema siehe Abbildung 4).

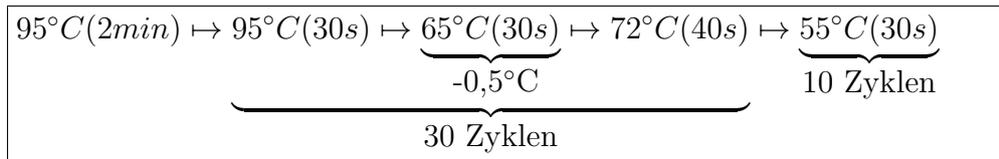


Abbildung 4: touch down PCR

## 4.18 Quantitative real-time PCR

Das zugrunde liegende Prinzip der quantitativen real-time PCR ist die kontinuierliche Messung eines Fluoreszenzsignals, dessen Intensität proportional zur Menge der amplifizierten DNA während der PCR ansteigt. Dadurch ist es möglich, eine quantitative Aussage über die anfänglich vorhandene Menge an DNA einer PCR zu erhalten.

### 4.18.1 TaqMan- PCR

Die TaqMan PCR ist eine Form der real-time quantitativen PCR, für die zunächst ein TaqMan - System, bestehend aus einer sequenzspezifischen TaqMan - Sonde und ein diese umgebendes Primerpaar mit forward und reverse Primer, erzeugt werden muss. Dabei ist im Falle der Amplifikation von cDNA darauf zu achten, dass die TaqMan- Sonde Exon- Exon Grenzen überschneidet, um eine Hybridisierung an genomischer DNA auszuschliessen. Das Prinzip der TaqMan - Sonde nutzt die 5'- 3' Exonukleaseaktivität der Taqpolymerase sowie den Förster resonance energy transfer (FRET) aus. Ein Reporter- Fluorochrom, das durch Licht einer bestimmten Wellenlänge angeregt wird, gibt einen Teil seiner Energie, in Form einer anderen Wellenlänge, an ein Quencher- Fluorochrom ab, das sich in ausreichender Nähe befinden muss. Der Abbau der TaqMan-Sonde durch die Taqpolymerase erhöht den Abstand zwischen Reporter und Quencher. Dadurch nimmt FRET und somit das Fluoreszenzsignal des Quencher ab, während das des Reporters zunimmt. Durch die Akkumulation des PCR- Produktes steigt die Fluoreszenz mit jedem weiteren Zyklus an (Beispiel siehe Abbildung 5).

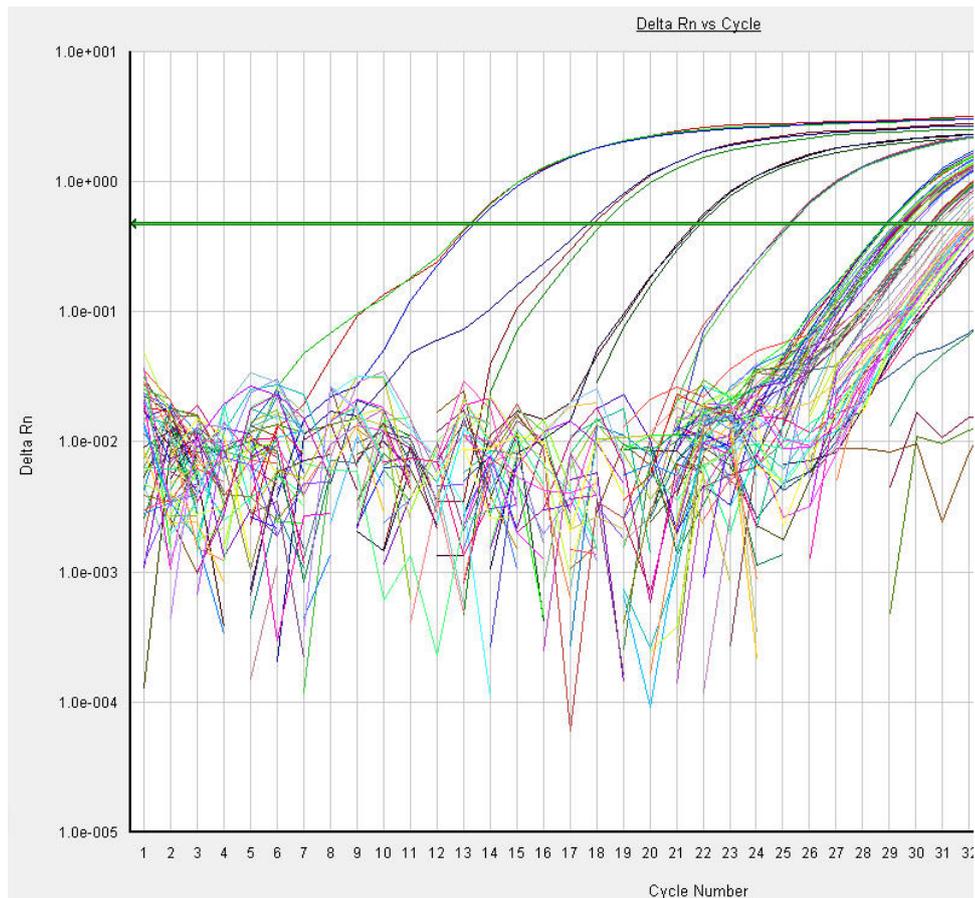


Abbildung 5: Delta Rn vs. Cycle

#### 4.18.2 SYBR Green

Eine andere Möglichkeit der Quantifizierung des PCR-Produktes ist die Verwendung des Fluoreszenzfarbstoffes SYBR-Green, der durch Interkalation mit doppelsträngiger DNA einen fluoreszenten Komplex bildet. Je mehr doppelsträngige DNA im Verlauf der PCR entsteht, desto stärker wird das Fluoreszenzsignal. Diese Methode ist im Vergleich zur TaqMan PCR unspezifischer, da SYBR Green mit jeder doppelsträngigen DNA interkaliert. Daher ist es notwendig, die Spezifität des PCR-Produktes anhand von Schmelzkurven zu überprüfen. Dabei wird die Fluoreszenzintensität bei zunehmender Temperatur aufgezeichnet und die

erste Ableitung des entstehenden Graphen durch die beigefügte Software angezeigt. Idealerweise zeigt sich hier nur ein Peak, wo hingegen sich bei Verunreinigung und Amplifikation von Nebenprodukten mehrere Peaks ergeben.

### 4.18.3 Oligonukleotide

Folgende Oligonukleotide wurden verwendet:

Standardprimer	Sequenz
Cox2 Standard Forward	5'-CCTACgAAggAACTCAgCTCTgTg
Cox2 Standard Reverse	5'-ggCTTCAGcggTAATTTgATTCT
PBGD Standard Forward	5'-CgACACTgTggTAgCgATgC
PBGD Standard Reverse	5'-CTCTgTAgCTgCgCCACTCTCCTC
VEGFa Standard Forward	5'-gAgATgAgCTTCCTgCAgCATA
VEGFa Standard Reverse	5'-CCTTgCAACgCgAgTCTgT
TaqManprimer	Sequenz
Cox2 Forward	5'-CCACCTCTgCgATgCTCTTC
Cox2 Reverse	5'-CATTCACCACggTTTTgACATg
PBGD Forward	5'-TgAAAACCTTgTACCCTggCATA
PBGD Reverse	5'-TCCAATCTTAgAgAgTgCAGTATCAAga
VEGFa Forward	5'-CgCAAgaAAATCCCggTTTAA
VEGFa Reverse	5'-CACgTCTgCggATCTTggA
TaqMan Sonde	Sequenz
PBGD Sonde	5'-TTgAAATCATTgCTATgTCCACCACagg
VEGFa Sonde	5'-TCCTggAgCgTTCAGTgTgAgCCTT

Tabelle 1: Oligonukleotide

## 4.19 Statistische Analyse

Die Auswertung der experimentell erhobenen Daten erfolgte mit SPSS 13.0 für Windows. Alle Werte wurden als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler des Mittelwertes (*mean*  $\pm$  *SEM*) angegeben. Die statistische Analyse erfolgte, nach Prüfung auf Normalverteilung, mithilfe des Mann-Whitney Test für nicht-parametrisch verteilte Populationen und mittels ANOVA mit Bonferoni post - hoc Test bzw. t - Test Einzeltestung bei parametrischer Verteilung. Die Überlebenszeitanalyse erfolgte nach der Kaplan-Meier-Methode mit dem Logrank-Test. Statistische Unterschiede wurden bei einem  $p \leq 0,05$  als signifikant angenommen. Für die grafische Darstellung der Ergebnisse wurde das Programm SigmaPlot verwendet.

## 4.20 Gruppeneinteilung und Studiendesign

Im Alter von 12 Wochen wurden insgesamt 79 Wistar Ratten randomisiert und den Eingriffen zugeteilt (siehe Tab. 2). Es wurde Everolimus in einer Dosierung verabreicht, die in einem Nierentransplantationsmodell der Ratte sowohl die akute (0,5 mg/kg Körpergewicht) als auch die chronische Abstossungsreaktion (2,5 mg/kg Körpergewicht) verhindern konnte [24]. Cyclosporin A wurde in einer Standarddosierung verabreicht. Die Durchführung der 5/6-Nx bzw. Kontrolloperation erfolgte in der 12. Lebenswoche. Die Untersuchungen wurden nach 28 Tagen postoperativ durchgeführt.

Gruppe	Behandlung	Substanz	Dosis
Ko	Kontrolloperation	/	
Nx	5/6-Nephrektomie	/	
Eniedrig	5/6-Nephrektomie	SDZ-RAD	0,5 mg/kgKG/d
Ehoch	5/6-Nephrektomie	SDZ-RAD	2,5 mg/kgKG/d
CyA	5/6-Nephrektomie	Cyclosporin A	10mg/kgKG/d

Tabelle 2: Studiendesign

## 5 Ergebnisse

### 5.1 Medikamentenspiegel

Die Bestimmung der Cyclosporin A und Everolimus Blutspiegel erfolgte über das Labor der Charité. Es wurden zufällig ausgewählte Proben der Gruppen CyA und Eniedrig zur Analyse versandt. Die in der Ehoch Gruppe verwendete Dosis ist im Tiermodell der Ratte etabliert und führt zu Talspiegeln von ca. 20-40 ng/ml (persönliche Kommunikation mit Dr. W. Schuler, Novartis). Der Cyclosporinspiegel betrug 90,3  $\mu\text{g/l}$ , der Everolimusspiegel der Eniedrig Gruppe betrug im Mittel 1,3  $\mu\text{g/l}$ .

### 5.2 Letalität und Gewichtsentwicklung

Die nephrektomierten Gruppen zeigten mit Ausnahme der CyA Gruppe eine niedrigere Gewichtszunahme pro Tag sowie ein niedrigeres Endgewicht gegenüber der Kontrollgruppe. Zusätzlich war in der Gruppe Ehoch die tägliche Gewichtsaufnahme und das Endgewicht niedriger als in der CyA Gruppe (siehe Tabelle 3). Die postoperative Letalität der Nephrektomie über den Zeitraum von 28 Tagen liegt bei ca. 10-20 %, wobei die Operationsletalität bei

ca. 5-10 % liegt. Insgesamt starben 16 von 60 nephrektomierten Tieren vorzeitig. Die Gruppe Ehoch wies mit 52,63 % die höchste Letalität auf. Sie war um den Faktor 2,6 im Vergleich zur unbehandelten Gruppe Nx erhöht. Die Letalität in den Gruppen Eniedrig und CyA war im Vergleich zur unbehandelten Gruppe Nx nicht erhöht. Die Überlebenszeitkurven zeigten einen Unterschied zwischen der Ehoch und der CyA Gruppe zu Gunsten der Cyclosporin A Behandlung (Log-Rank-Test:  $p=0,003$ ). Die Gruppe Ehoch wies das höchste Risiko auf, zu Beginn der Beobachtungsperiode zu versterben (Log-Rank-Test:  $p < 0,01$  im Vergleich mit der Kontrollgruppe) (siehe Abb. 6).

Gruppe	Gewichtszunahme ( $\text{g} \cdot \text{Tag}^{-1}$ )	Endgewicht (%)	Letalität (%)
Ko	$3,08 \pm 0,97 \# \dagger$	$123 \pm 7 \# \dagger$	0
Nx	$-1,74 \pm 0,95 *$	$113 \pm 7 * \dagger$	20
Eniedrig	$-0,277 \pm 2,22 * \#$	$98 \pm 17 *$	20
Ehoch	$-2,32 \pm 1,20 *$	$83 \pm 7 * \#$	52,63*
CyA	$1,96 \pm 0,71 \# \dagger$	$114 \pm 5 \dagger$	9,5\dagger

Tabelle 3: Endgewicht in Prozent des Ausgangsgewichtes und 28 Tage Letalität \* :  $p < 0,05$  vs. Kontrolle; # :  $p < 0,05$  vs. Nx; † :  $p < 0,05$  vs. Ehoch

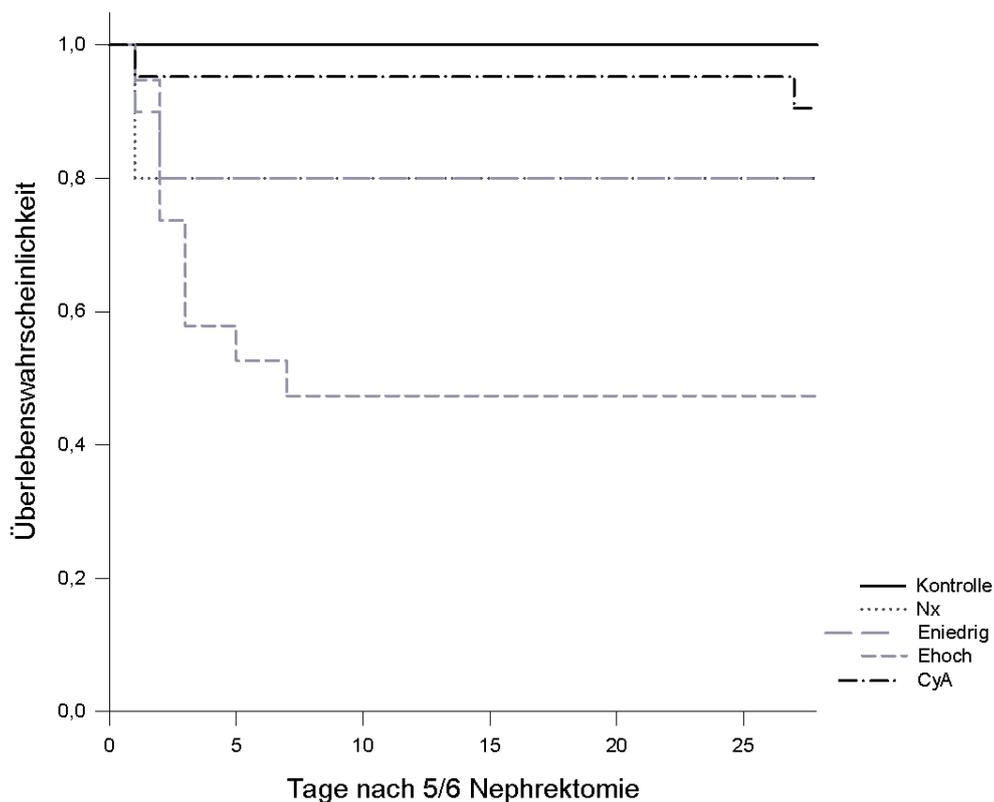


Abbildung 6: Schätzung der Überlebensfunktion

### 5.3 Systolischer Blutdruck

Der ermittelte systolische Blutdruck war in den nephrektomierten Gruppen mit Ausnahme der Ehoch Gruppe gegenüber der Kontrollgruppe erhöht (siehe Abb. 7). Es bestand kein Unterschied bezüglich des systolischen Blutdruckanstiegs nach 5/6 Nephrektomie zwischen den mit Cyclosporin A behandelten und den unbehandelten Tieren. In der Gruppe Eniedrig war der systolische Blutdruck um 18 mmHg gegenüber der unbehandelten Nx Gruppe erhöht. Die Gruppe Ehoch zeigte verglichen mit der Nx Gruppe einen um 28mmHg niedrigeren systolischen Blutdruck (siehe Abb. 7).

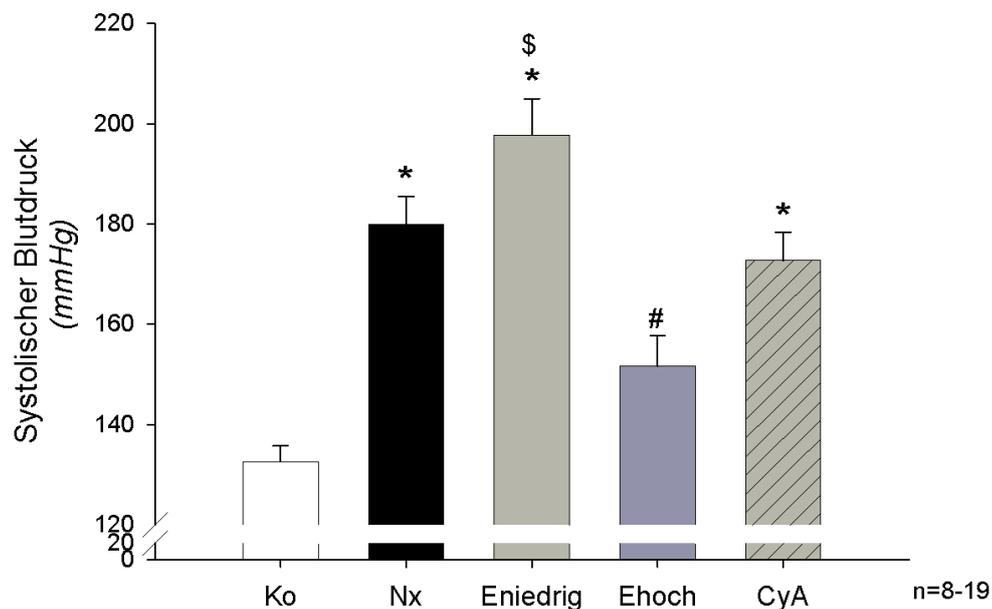


Abbildung 7: Systolischer Blutdruck nach 28 Tagen \* :  $p < 0,05$  vs. Kontrolle; # :  $p < 0,05$  vs. Nx; \$ :  $p < 0,05$  vs. Ehoch und CyA

### 5.4 Linksventrikuläres Gewicht

In allen operierten Gruppen zeigte sich eine linksventrikuläre Hypertrophie (LVH) im Vergleich zur Kontrollgruppe. Die Gruppe CyA zeigte zudem ein im Vergleich zur Nx Gruppe um 11% niedrigeres linksventrikuläres Gewicht. Die mit Everolimus behandelten Gruppen wiesen ein zur unbehandelten Gruppe Nx vergleichbares linksventrikuläres Gewicht auf (siehe Abb. 8 auf der nächsten Seite).

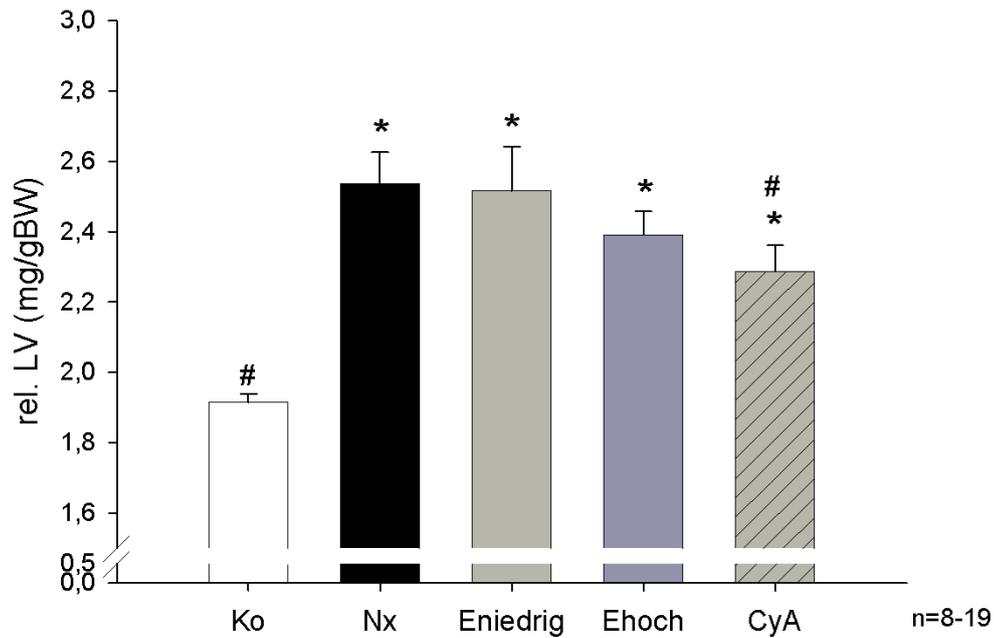


Abbildung 8: Relatives linksventrikuläres Gewicht nach 28 Tagen \* :  $p < 0,05$  vs. Kontrolle; # :  $p < 0,05$  vs. Nx

## 5.5 Rechtsventrikuläres Gewicht

Eine Hypertrophie des rechten Ventrikels zeigte sich in den Gruppen Ehoch und der unbehandelten Gruppe Nx. In der Gruppe Eniedrig zeigte sich kein Unterschied in der Ausprägung einer rechtsventrikulären Hypertrophie im Vergleich zur Kontrollgruppe. Die mit Cyclosporin A behandelten nephrektomierten Tiere zeigten im Vergleich zur Nx Gruppe und verglichen mit der Ehoch Gruppe ein niedrigeres relatives rechtsventrikuläres Gewicht und befanden sich auf dem Niveau der Kontrollgruppe (siehe Abb. 9 auf der nächsten Seite).

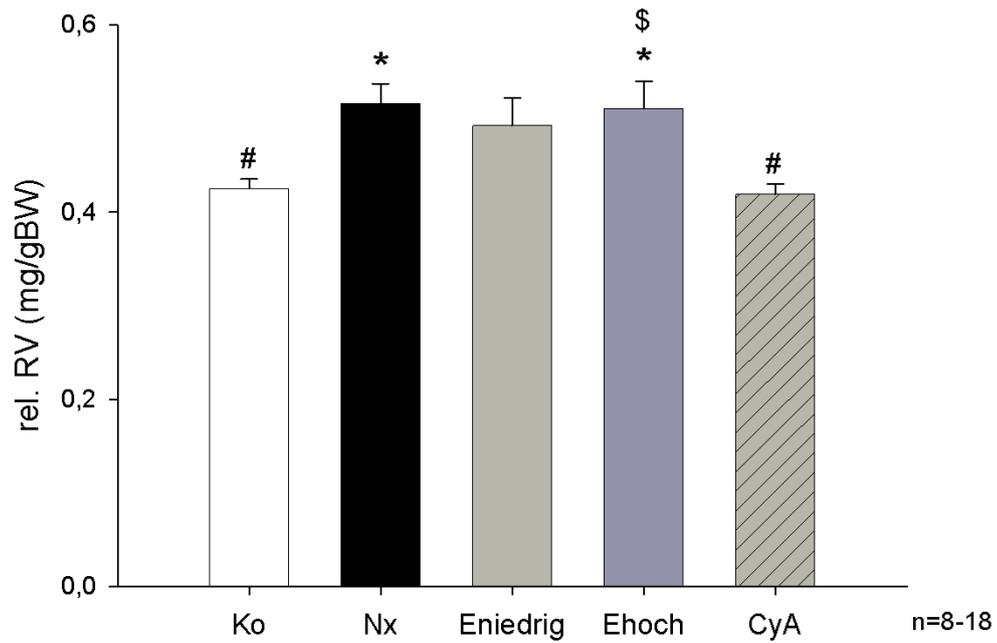


Abbildung 9: Relatives rechtsventrikuläres Gewicht nach 28 Tagen \* :  $p < 0,05$  vs. Kontrolle; # :  $p < 0,05$  vs. Nx \$ :  $p < 0,05$  vs. CyA

## 5.6 Aortengewicht

Das relative Gewicht der Aorta in mg/mm als Marker der vaskulären Hypertrophie war in allen nephrektomierten Gruppen gegenüber der Kontrollgruppe erhöht. Es zeigte sich zudem eine weniger stark ausgeprägte vaskuläre Hypertrophie in der mit Cyclosporin A behandelten Gruppe. Die Eniedrig und Ehoch Gruppe unterschied sich nicht von der unbehandelten Nx Gruppe (siehe Abb. 10 auf der nächsten Seite).

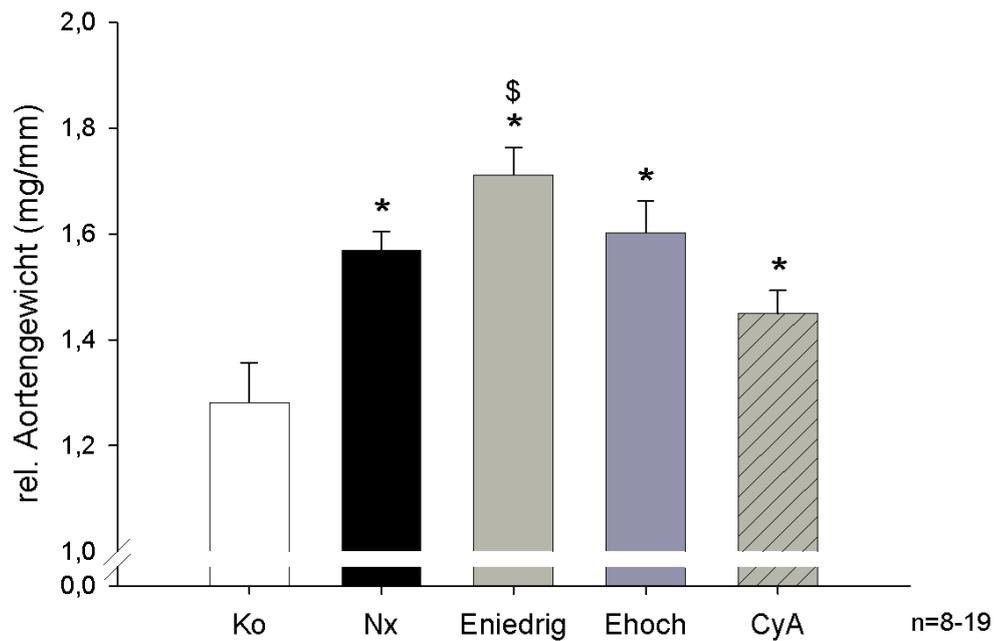


Abbildung 10: Relatives Aortengewicht \* :  $p < 0,05$  vs. Kontrolle; § :  $p < 0,05$  vs. CyA

## 5.7 Linksventrikuläre Funktion

### 5.7.1 Maximale linksventrikuläre Druckanstiegsgeschwindigkeit

Die maximale linksventrikuläre Druckanstiegsgeschwindigkeit ( $+dp/dt/LVP_{max}$ ) als Parameter zur Einschätzung der systolischen linksventrikulären Funktion war in der Gruppe Eniedrig um 9% niedriger als die Kontrollgruppe. Es bestand kein Unterschied zwischen den übrigen operierten Gruppen (siehe Abb. 11 auf der nächsten Seite).

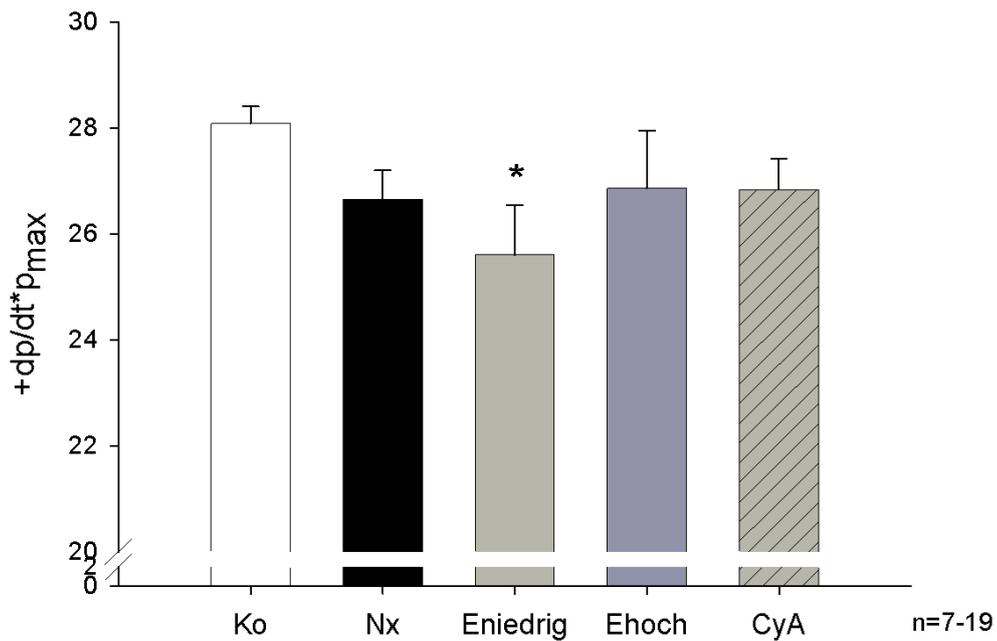


Abbildung 11: linksventrikuläre maximale Druckanstiegsgeschwindigkeit  $dp/dt/Max$  (mm-Hg/s) nach 28 Tagen \* :  $p < 0,05$  vs. Kontrolle

### 5.7.2 Maximale linksventrikuläre Druckabfallsgeschwindigkeit

Die maximale linksventrikuläre Druckabfallsgeschwindigkeit ( $-dp/dt/LVP_{max}$ ) als Zeichen einer diastolischen Relaxationsstörung im Sinne einer diastolischen Herzinsuffizienz war in den Gruppen Ehoch und CyA um 11 % und in der Gruppe Eniedrig um 13 % niedriger als in der Kontrollgruppe. Kein Unterschied zeigte sich zwischen der gesunden Kontrollgruppe und der unbehandelten Nx Gruppe (siehe Abb. 12 auf der nächsten Seite).

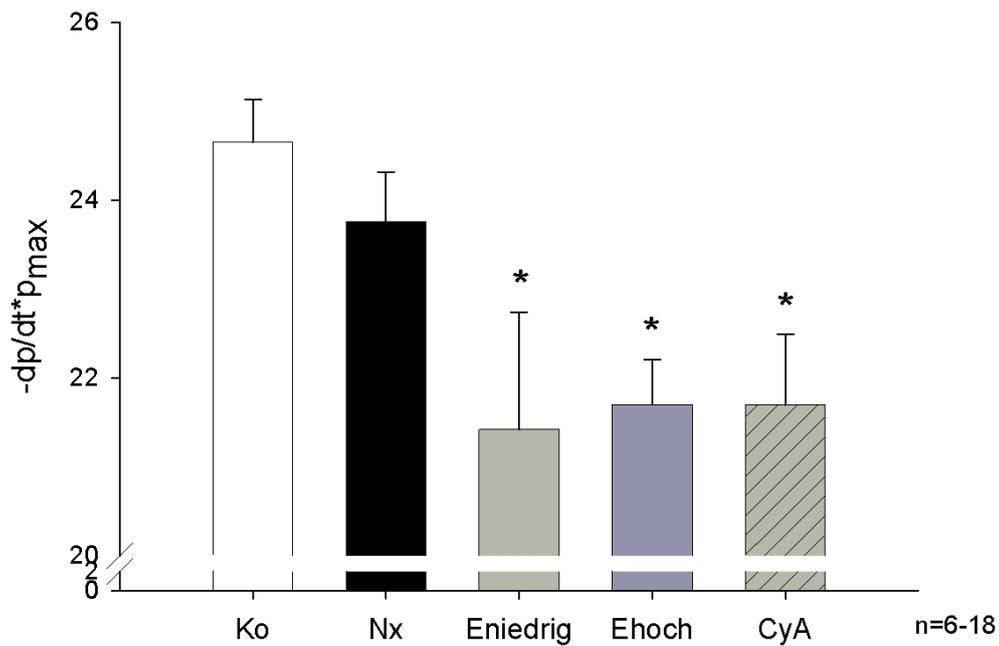


Abbildung 12: linksventrikuläre maximale Druckabfallgeschwindigkeit  $dp/dt/Min$  (mmHg/s) nach 28 Tagen \* :  $p < 0,05$  vs. Kontrolle

## 5.8 Serumkreatinin und Kreatinin-Clearance

Das Serumkreatinin war in der Nx Gruppe um 162% gegenüber der Kontrollgruppe erhöht und die Kreatinin-Clearance um 53% niedriger (siehe Abb. 13 auf der nächsten Seite und Abb. 14 auf der nächsten Seite). In der Ehoch Gruppe zeigte sich ein Serumkreatininanstieg um 51% gegenüber der Nx Gruppe und ein Abfall der Kreatininklearance um 31%. Die Ehoch Gruppe zeigte zusätzlich eine Erhöhung des Serumkreatinins um 39% und eine um 33% niedrigere Kreatinin-Clearance gegenüber der CyA Gruppe.

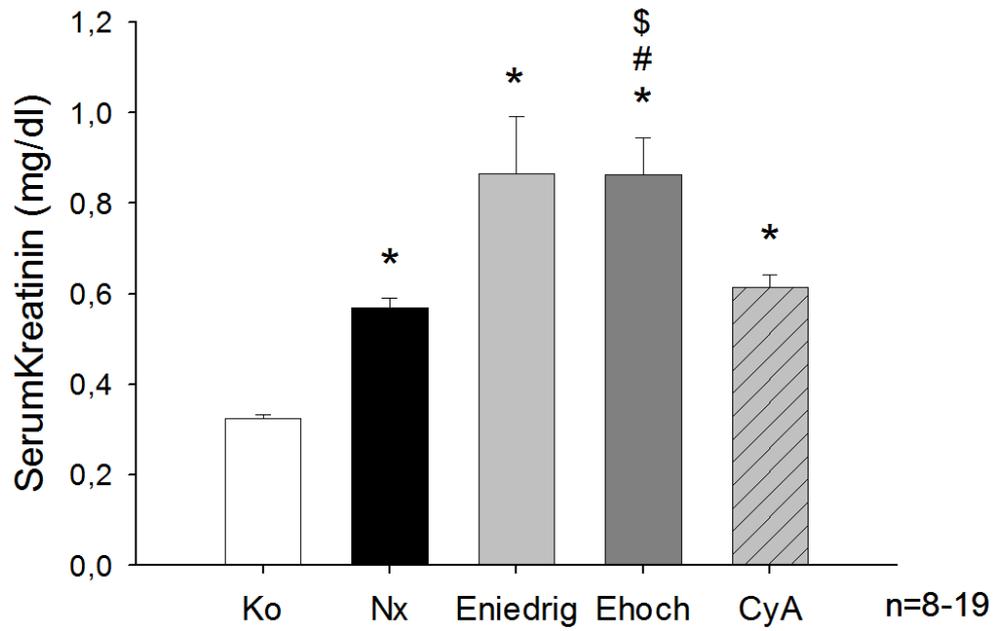


Abbildung 13: Serumkreatinin nach 28 Tagen

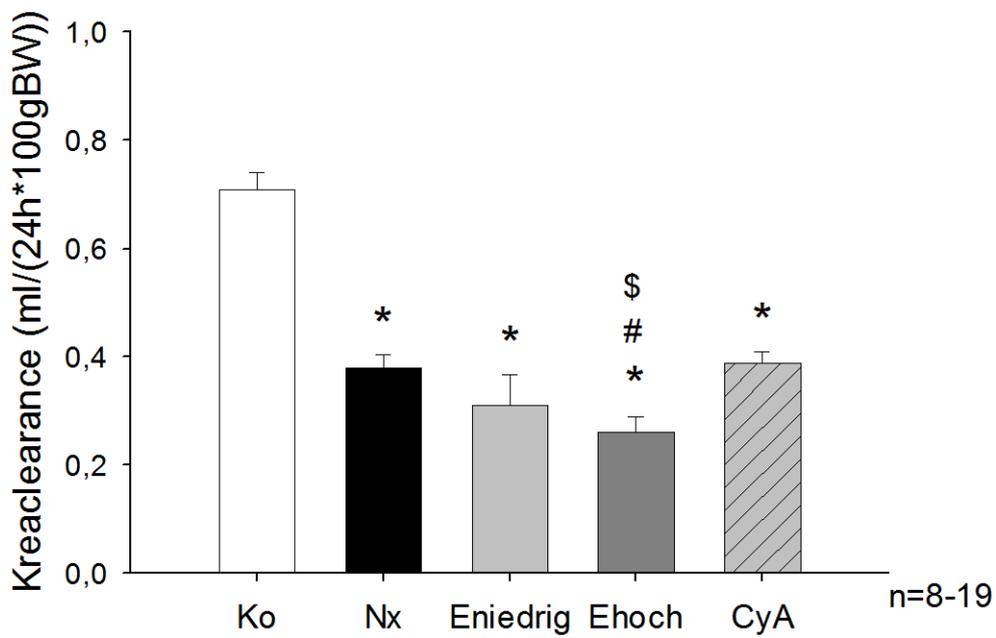


Abbildung 14: Kreatinin-Clearance pro 100mg Körpergewicht

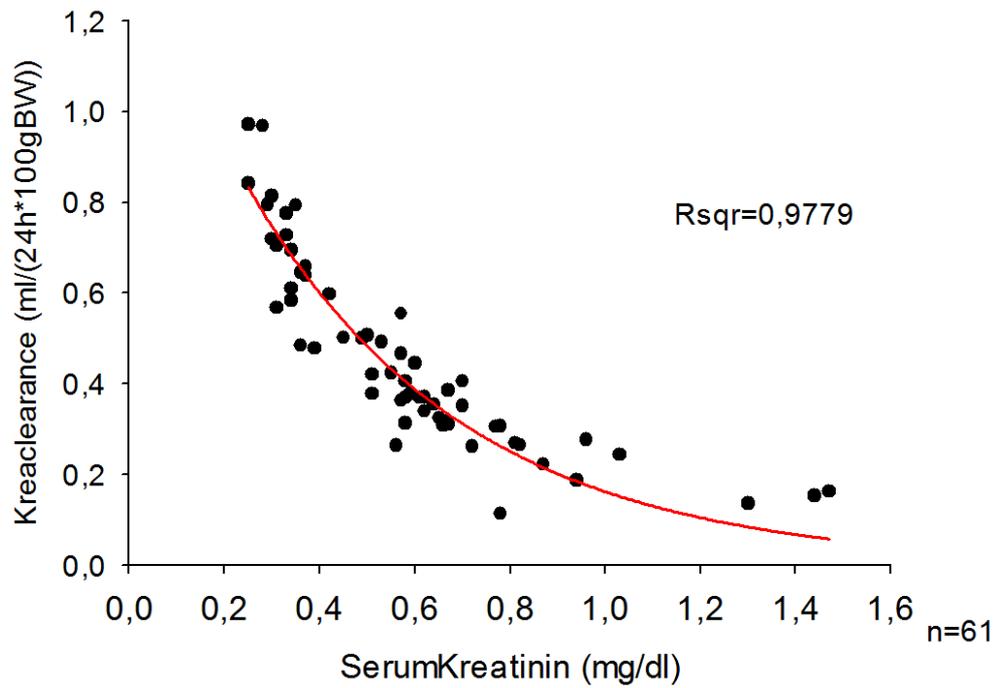


Abbildung 15: GFRBW vs Serumkreatinin über alle Gruppen

## 5.9 Albuminurie und Proteinurie

Die nephrektomierten Gruppen wiesen eine gegenüber der Kontrollgruppe erhöhte Proteinurie und Albuminurie auf. Die Eniedrig Gruppe zeigte eine höhere Albuminurie im Vergleich mit der CyA Gruppe (siehe Abb. 16 auf der nächsten Seite und Abb. 17 auf der nächsten Seite).

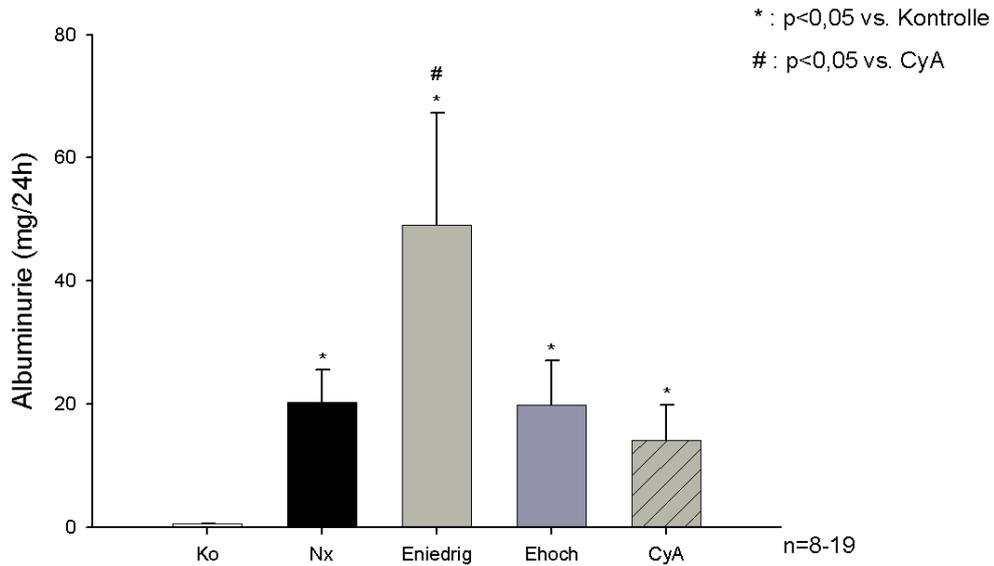


Abbildung 16: Albuminurie nach 28 Tagen

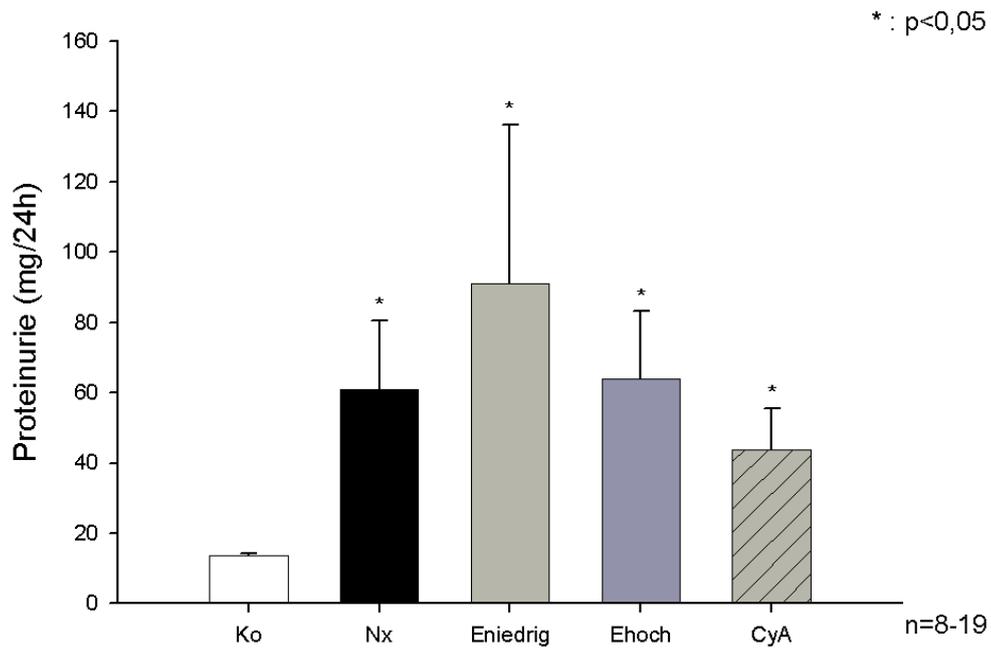


Abbildung 17: Proteinurie nach 28 Tagen

## 5.10 Klinische Chemie

Die fraktionierte Natriumausscheidung (FENA) war in den mit Everolimus behandelten Gruppen Eniedrig und Ehoch gegenüber den Kontrolltieren erhöht. Des Weiteren zeigte sich

eine höhere FENA in der Eniedrig Gruppe im Vergleich mit der CyA Gruppe. Die fraktionierte Harnstoffausscheidung (FEHST) war in der Ehoch Gruppe gegenüber den Kontrolltieren und der unbehandelten Nx Gruppe erhöht. Die mit Cyclosporin A und Everolimus in niedriger Dosis behandelten Tiere zeigten keine Erhöhung der FEHST. Der Serumalbuminspiegel war in der Ehoch Gruppe sowohl gegenüber den Kontrolltieren, der unbehandelten Nx Gruppen, als auch gegenüber der CyA Gruppe erhöht. Zwischen den restlichen Gruppen zeigte sich kein Unterschied in der Höhe des Serumalbumins. Die Serumtriglyzeride waren in allen Gruppen unverändert im Vergleich zur Kontrollgruppe (siehe Tabelle 4).

Gruppe	FENA	FEHST (%)	SAlbumin (g/l)	STriglyzeride (mg/dl)
Ko	0,32±0,07	77 ±2,1	8,28 ±0,38	85,11 ±36,29
Nx	0,83±0,24*	76 ±2,0	7,57 ±0,83	73,43 ±21,90
Eniedrig	1,64 ± 1,3*	79 ±5,0	6,53 ±1,62	85,25 ±24,38
Ehoch	1,16±0,78*	90 ±2,0 * #	5,54 ±0,67 * #§	120,44 ±53,52
CyA	0,77±0,27 * †	84 ±2,0	7,70 ±0,81†	99,94 ±37,20

Tabelle 4: Fraktionierte Natriumausscheidung (FENA), Fraktionierte Harnstoffausscheidung (FEHST), Serum Albumin und Serum Triglyzeride \* :  $p < 0,05$  vs. Kontrolle; # :  $p < 0,05$  vs. Nx; † :  $p < 0,05$  vs. Eniedrig; † :  $p < 0,05$  vs. Ehoch; § :  $p < 0,05$  vs. CyA

## 5.11 COX2 mRNA-Expression

Die COX2 mRNA Expression war in der CyA Gruppe um 123% höher als in der Kontrollgruppe (siehe Abb. 18).

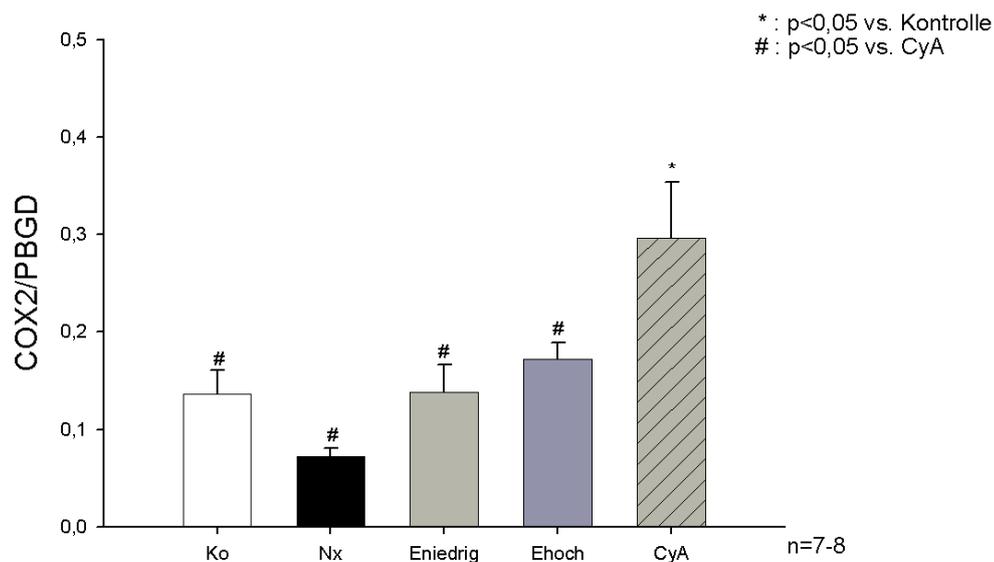


Abbildung 18: COX2 mRNA-Expression nach 28 Tagen

## 5.12 VEGF mRNA-Expression

Die VEGF mRNA Expression war in der CyA Gruppe um 36% höher als in der Kontrollgruppe (siehe Abb. 19).

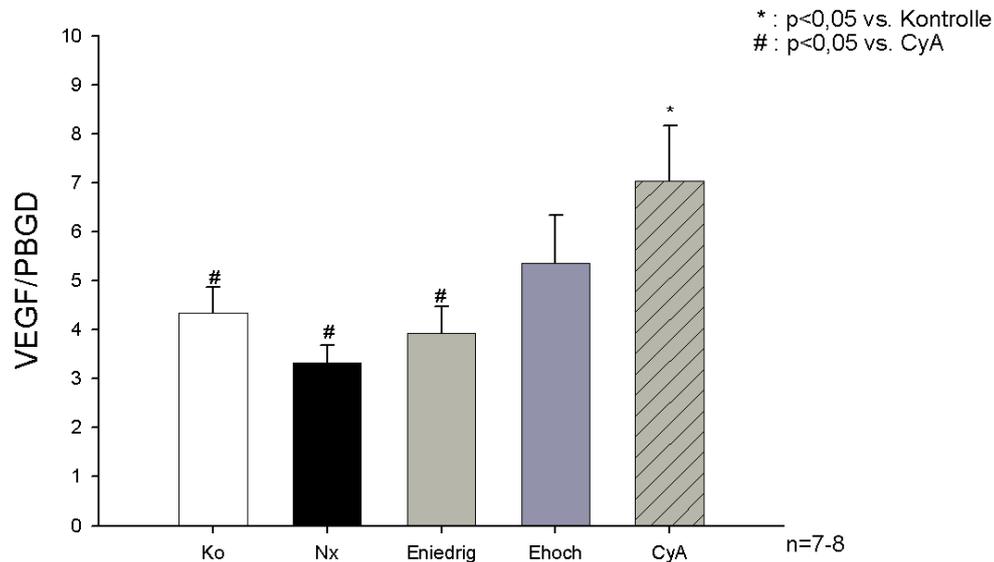


Abbildung 19: VEGF mRNA-Expression nach 28 Tagen

## 6 Diskussion

### 6.1 Letalität und Gewichtsentwicklung

Die mit Everolimus behandelten Tiere zeigten eine niedrigere Gewichtszunahme und in der höheren Dosis ein signifikant niedrigeres relatives Endgewicht verglichen mit der unbehandelten Nx Gruppe, wobei die Eniedrig Gruppe aufgrund der grossen Varianz keine Signifikanz erreichte. Diarrhoen und Infektionen konnten als Ursache der verminderten Gewichtszunahme ausgeschlossen werden, da die Tiere engmaschig überwacht wurden. Vergleichbare tierexperimentelle Studien zeigten in niedrigerer Dosierung von Everolimus keinen, jedoch in höherer Dosierung ebenfalls einen steigenden Einfluss auf die Gewichtsentwicklung. Deters et al. untersuchten die Wirkung von Everolimus allein und in Kombination mit Cyclosporin A auf den Gallenfluss an gesunden Wistar Ratten und sahen nach 2 wöchiger intraperitonealer Gabe von Everolimus in einer Dosis von 1 mg/kg Körpergewicht keinen Einfluss auf die Gewichtsentwicklung verglichen mit Placebo [25]. Höcherl et al. zeigten in Untersuchungen zur Nierenfunktion und zur renalen Expression der Cyclooxygenase 2 (COX-2) an Sprague-Dawley Ratten einen signifikant negativen Einfluss der Everolimusgabe von 3 mg/kg

Körpergewicht auf die Gewichtsentwicklung, unabhängig von einer Nidrigsalzdiät oder der Blutdrucksenkung durch einen AT1 Rezeptorantagonisten oder ein Schleifendiuretikum [26]. Ein dosisabhängiger negativer Effekt auf die Gewichtsentwicklung durch den mTor Inhibitor Sirolimus wurde bereits an Wistar Furth Ratten beschrieben [27]. Rovira et al. untersuchten an 15 Wochen alten Wistar Ratten den Einfluss von Sirolimus auf die Gewichtsentwicklung nach 10 Wochen. Sie bemerkten bei gleicher Nahrungs- und Wasseraufnahme eine um 30% signifikant niedrigere Gewichtszunahme bei den mit Sirolimus behandelten Tieren verglichen mit der Kontrollgruppe. Die Autoren beobachteten zudem eine Reduktion des Adipozyten-durchmessers und eine erhöhte Insulinsensitivität unter der Behandlung mit Sirolimus [28]. Im Gegensatz zu den beschriebenen Befunden führt Sirolimus intracerebroventrikulär appliziert zu einer rapide sinkenden Nahrungsaufnahme. Cota et al. identifizierten für die Ratte den hypothalamischen Nucleus arcuatus als essentiell für die mTor und Leptin mediierte Regulation der Nahrungsaufnahme und der Energiebalance [29]. Hohe mTor Aktivität und Expression war hier mit einer signifikanten Gewichtsabnahme assoziiert. Als mögliche Erklärung für die bestehende Diskrepanz zwischen den hier beobachteten und den zitierten Befunden mag die Dauer des Applikationszyklusses dienen, so dass eine unterschiedliche kurz- und langfristige Regulation bzw. Adaptation denkbar wäre. Für de novo nierentransplantierte Patienten konnten Diekmann et al. in einer post hoc Analyse von fünf klinischen Studien einen Zusammenhang der Behandlung mit dem mTOR Inhibitor Sirolimus innerhalb der ersten sechs Monate und einer niedrigeren Gewichtszunahme beschreiben [30].

Die mit Cyclosporin A behandelten Tiere waren im Hinblick auf das relative Endgewicht den unbehandelten nephrektomierten Tieren vergleichbar, obwohl sie eine im Durchschnitt niedrigere tägliche Gewichtszunahme aufwiesen. Auch für Cyclosporin A wurde im Tiermodell eine verminderte Nahrungsaufnahme beschrieben [27]. Güray et al. verabreichten im gleichen 5/6 Nierenreduktionsmodell der Ratte Cyclosporin A intraperitoneal in einer vergleichbaren Dosierung (10mg/Kg Körpergewicht) und konnten nach 28 Tagen ebenfalls keinen Unterschied zu unbehandelten Tieren feststellen [31]. In der vorliegenden Untersuchung wirkte sich die Gabe von Cyclosporin A im Vergleich mit der Ehoch Gruppe signifikant geringer auf die Gewichtsentwicklung aus. Die Letalität insbesondere in der unmittelbaren Phase nach Nierenschädigung war in der Ehoch Gruppe deutlich erhöht (siehe Abb. 6 auf Seite 23). Es bestand ein signifikanter Unterschied der Überlebenschancen in der Log-Rank Analyse gegenüber den mit Everolimus in der höheren Dosierung behandelten Tieren und den mit Cyclosporin behandelten Tieren bzw. der Kontrollgruppe ( $p=0,003$  und  $p=0,0003$ ). Ein direkter Zusammenhang der erhöhten Letalität der Ehoch Gruppe mit der verminderten Gewichtszunahme erscheint aufgrund der zeitlichen Nähe zum Operationszeitpunkt eher unwahrscheinlich.

In den anderen nephrektomierten Gruppen zeigte sich keine erhöhte Letalität im Vergleich

mit unbehandelten nephrektomierten Tieren. Die durchgeführten Autopsien der verstorbenen Tiere liessen eine Blutung als Ursache ausschliessen, so dass von einem Tod durch akutes Nierenversagen ausgegangen werden kann.

## 6.2 Systolischer Blutdruck, Herzhypertrophie und vaskuläre Hypertrophie

Im angewandten 5/6 Nephrektomiemodell der Ratte entwickeln die Tiere durch teilweise Infarzierung der linken Niere einen ausgeprägten renalen Hypertonus, im Gegensatz zum 5/6 Nephrektomiemodell durch chirurgische Exzision des oberen und unteren Nierenpols, in dem keine signifikante Blutdrucksteigerung erreicht wird [32]. 28 Tage nach der Operation zeigte sich ein signifikanter Unterschied von  $47 \text{ mmHg} \pm 7,2$  zwischen den gesunden Kontrolltieren und der nephrektomierten, unbehandelten Nx Gruppe (Kontrolle  $132 \text{ mmHg} \pm 3,1$  vs. Nx  $180 \text{ mmHg} \pm 5,7$ ). Es entwickelte sich ferner als Folge des systolischen Blutdruckes eine linksventrikuläre Hypertrophie mit einer signifikanten Zunahme des relativen linksventrikulären Gewichtes nach 5/6 Nephrektomie im Vergleich zu den Kontrolltieren. Ebenso zeigte sich eine Vergrösserung des rechten Ventrikels als kompensatorische Folge einer Volumenbelastung bzw. einer Linksherzinsuffizienz. Als weiterer hypertensiver Endorganschaden war das relative Aortengewicht nach Nephrektomie signifikant erhöht, was in diesem Modell durch ein hypertrophes remodelling der intima media begründet ist [33].

Die Behandlung mit Everolimus in zwei Dosierungen führte im verwandten Modell zu unterschiedlichen Ergebnissen. So wiesen die Tiere der Eniedrig Gruppe mit  $198 \text{ mmHg} \pm 7,3$  von allen untersuchten Gruppen den höchsten systolischen Blutdruck auf, der mit  $65 \text{ mmHg}$  gegenüber der Kontrollgruppe und  $18 \text{ mmHg}$  gegenüber den unbehandelten nephrektomierten Tieren erhöht war. Korrespondierend zu diesem Befund zeigte sich die vaskuläre Hypertrophie besonders ausgeprägt, erreichte aber keine Signifikanz gegenüber der unbehandelten Nx Gruppe. Die linksventrikuläre Hypertrophie war vergleichbar mit der unbehandelten Nx Gruppe und das relative rechtsventrikuläre Gewicht zeigte sich nicht signifikant gegenüber der Kontrollgruppe erhöht, wies allerdings auch keine Signifikanz zur unbehandelten Nx Gruppe auf.

In der höheren Dosierung mit  $2,5 \text{ mg/kg}$  Körpergewicht zeigte die Behandlung mit Everolimus unerwartet einen signifikant niedrigeren Blutdruck gegenüber der unbehandelten Nx Gruppe, sowie einen mit einer Differenz von  $46 \text{ mmHg} \pm 9,8$  deutlich niedrigeren systolischen Blutdruck gegenüber der Behandlung mit Everolimus in der niedrigeren Dosis von  $0,5 \text{ mg/kg}$  Körpergewicht. Hinsichtlich der Ausprägung hypertensiver Endorganschäden befand sich die Ehoch Gruppe auf dem Niveau der unbehandelten Nx Gruppe in Bezug auf die Ausprägung

der linksventrikulären Hypertrophie, der rechtsventrikulären Hypertrophie und des relativen Aortengewichtes. Durch das Auftreten von typischen hypertensiven Endorganschäden in der Ehoch Gruppe, in einer Ausprägung, die der unbehandelten Nx Gruppe und der Eniedrig Gruppe vergleichbar ist, erscheint eine frühere erhebliche Steigerung des systolischen Blutdruckes durchaus denkbar, zumal die Tiere einen schlechten klinischen Zustand, eine negative Gewichtsbilanz und eine hohe Letalität aufwiesen.

Vogelbacher et al. konnten in einem vergleichbaren Modell keinen Einfluss der Everolimusgabe auf den Blutdruck zeigen, begannen mit der Everolimusgabe allerdings auch am 3. postoperativen Tag, so dass der Einfluss der Interferenz von Everolimus mit frühen adaptativen Prozessen im 5/6 Nephrektomiemodell der Ratte nicht untersucht werden konnte [34].

Die Einschätzung der myokardialen Funktion erfolgte anhand der maximalen linksventrikulären Druckanstiegs- und Druckabfallsgeschwindigkeit (siehe Abb. 11 auf Seite 28 und Abb. 12 auf Seite 29). Einzig die Eniedrig Gruppe zeigte Zeichen einer beeinträchtigten systolischen linksventrikulären Funktion. Hinsichtlich der diastolischen linksventrikulären Funktion zeigten sowohl die mit Everolimus, als auch die mit Cyclosporin A behandelten nephrektomierten Gruppen eine eingeschränkte linksventrikuläre Relaxation.

Der mTOR Signalweg spielt eine zentrale Rolle im Zellzyklus durch eine Modulation der Translationsprozesse und ist daher auch an der kardialen Hypertrophie beteiligt. Derzeit existieren zum Teil widersprüchliche Ergebnisse hinsichtlich der Beeinflussung der kardialen Hypertrophie durch mTOR Inhibitoren. Ein intakter mTOR/p70 S6K Signalweg scheint essentiell für die schnelle, adaptative Myokardhypertrophie im experimentellen Drucküberlastungsmodell der Ratte durch aortic banding zu sein [35]. Kemi et al. zeigten in einem Mausmodell eine Aktivierung von mTOR bei physiologischer kardialer Hypertrophie durch Ausdauertraining und eine Inaktivierung von mTOR in Kombination mit einer Reaktivierung fetaler Genprogramme (schwere  $\beta$ -myosin Kette, atrialer natriuretischer Faktor, Skelettmuskel Aktin) durch Drucküberlastung [36]. In einem transgenen Mausmodell konnten Shen et al. wiederum keinen Einfluss der mTOR Kinaseaktivität auf die kardiale Hypertrophie, wohl aber auf die kardiale Funktion zeigen [37].

Im hier verwandten 5/6 Nephrektomiemodell der Ratte zeigte sich zusammenfassend kein Einfluss von Everolimus auf die Ausprägung der kardialen Hypertrophie und der vaskulären Hypertrophie, jedoch eine gestörte diastolische Relaxation und eine eingeschränkte systolische myokardiale Funktion in der Ehoch Gruppe.

Die Cyclosporin A Behandlung zeigte keinen Einfluss auf die Erhöhung des systolischen Blutdruckes nach 5/6 Nephrektomie. Die Ausprägung hypertensiver Endorganschäden wurde am Herzen deutlich gemildert. So zeigte sich sowohl die links-, als auch die rechtsven-

trikuläre Hypertrophie im Vergleich zu der unbehandelten Nx Gruppe signifikant niedriger ausgeprägt. Ebenfalls signifikant vermindert war das relative Aortengewicht. Die kardiale Funktion gemessen an der maximalen linksventrikulären Druckanstiegsgeschwindigkeit, war unverändert im Vergleich zur unbehandelten Nx Gruppe, jedoch wies die CyA Gruppe eine verminderte maximale linksventrikuläre Druckabfallsgeschwindigkeit im Sinne einer diastolischen Insuffizienz auf. Es ist bekannt, dass der Kalzium-Calcineurin Signalweg in die Entstehung der kardialen Hypertrophie involviert ist [38] und Cyclosporin A über Inhibition von Calcineurin mit der Expression hypertropher genetischer Programme interferiert [39]. Goldspink et al. konnten im Tiermodell eine Abschwächung der Angiotensin II induzierten linksventrikulären Hypertrophie durch Cyclosporin A zeigen [40]. Oie et al. zeigten in einem postischämischen Herzinsuffizienzmodell der Ratte ebenfalls eine verminderte linksventrikuläre Hypertrophie, jedoch darüber hinaus eine vermehrte Dilatation des linken Ventrikels, die ebenfalls mit einer Relaxationsstörung des linken Ventrikels einherging [41]. Eine Inhibition der physiologischen Anpassung des Herzens an eine dauerhafte Nachlasterrhöhung scheint in dem betrachteten Modell zu Lasten der kardialen Funktion zu gehen. Um diese Frage klären zu können, müsste eine Einschätzung des pulmonalvenösen Druckes vorgenommen werden, was jedoch nicht Gegenstand der vorliegenden Arbeit ist. Zusammenfassend lässt sich im Modell der 5/6 nephrektomierten Ratte ein protektiver Effekt der Cyclosporin A Behandlung auf die Ausprägung der kardialen Hypertrophie und des vaskulären remodellings nachweisen.

### 6.3 Nierenfunktion

Allgemein ist die Bestimmung der Kreatinin-Clearance bei Ratten als Einschätzung der glomerulären Filtrationsrate umstritten. Dies wird auf eine unterschiedliche aktive tubuläre Sekretion von Kreatinin in Abhängigkeit vom verwendeten Tierstamm zurückgeführt. Daher wurde eine Korrelation für alle 61 untersuchten Tiere der bestimmten, auf das Körpergewicht normalisierten, Kreatinin-Clearance mit dem Serumkreatininwert in einer einfachen nicht linearen Regression (Hyperbelfunktion) durchgeführt. Es zeigte sich ein  $r^2$  von 0,9779 (siehe Abb. 15 auf Seite 31). Des Weiteren sind die gemessenen Clearancewerte der Kontrolltiere vergleichbar mit publizierten Daten der glomerulären Filtrationsrate gemessen durch die Inulin Clearance an anästhesierten Ratten [42]. Die durchgeführte 5/6 Nephrektomie führte in allen nephrektomierten Gruppen zu einem signifikanten Anstieg des Serumkreatinins und zu einem signifikanten Abfall der auf das Körpergewicht normalisierten Kreatinin-Clearance. In den mit Everolimus in unterschiedlicher Dosierung behandelten Gruppen, zeigte sich eine dosisabhängige Verschlechterung der Nierenfunktion anhand einer signifikant niedrigeren Kreatinin-Clearance der Ehoch Gruppe gegenüber der unbehandelten Nx Gruppe und den mit Cyclosporin A behandelten nephrektomierten Tieren. Albuminurie und Proteinurie wa-

ren ebenfalls nach 5/6 Nephrektomie in allen Gruppen gegenüber den Kontrolltieren erhöht, erreichten aber nur in der Eniedrig Gruppe Signifikanz gegenüber der CyA Gruppe (siehe Abb. 16 auf Seite 32 und Abb. 17 auf Seite 32). Die fraktionierte Natriumausscheidung (FENA) stieg nach Nephrektomie in der unbehandelten Nx Gruppe und der CyA Gruppe leicht an, erreichte aber nur in den mit Everolimus behandelten Gruppen ein signifikantes Niveau. Die fraktionierte Harnstoffausscheidung (FEHST) war in der Ehoch Gruppe gegenüber den Kontrolltieren und der unbehandelten Nx Gruppe erhöht. Die mit Cyclosporin A und Everolimus in niedriger Dosis behandelten Tiere zeigten keine Erhöhung der FEHST (siehe Tab. 4 auf Seite 33). Beim Menschen kann anhand der fraktionierten Natriumausscheidung eine valide Einschätzung des akuten Nierenversagens (ANV) hinsichtlich prärenal und renaler Genese vorgenommen werden [43]. Hier spricht eine FENA kleiner als 1 für ein prärenales ANV und grösser als 2 für ein renales ANV. Da für die Ratte keine Normalwerte der FENA existieren, ist eine solche Aussage schwer zu treffen. Der signifikante Anstieg der fraktionierten Natriumausscheidung in den Everolimusgruppen im Vergleich lässt aber auf eine verminderte tubuläre Reabsorption im Sinne einer tubulären Nekrose schliessen. Der im Vergleich zur unbehandelten Nx Gruppe signifikant niedrigere Serumalbuminspiegel der Ehoch Gruppe bietet u.a. auch eine mögliche Erklärung für den unerwartet niedrigen systolischen Blutdruck der Ehoch Gruppe.

Unter bestimmten Umständen können die mTOR Inhibitoren, die antiproliferativ, immunsuppressiv und per se nicht nephrotoxisch wirken, die Nierenfunktion beim Menschen verschlechtern. Dies ist bei nierentransplantierten Patienten nach der Umstellung von einem immunsuppressiven Regime mit Calcineurininhibitoren auf mTOR Inhibitoren beschrieben [44]. Eine wichtige Rolle scheint dabei das Ausmaß des vorbestehenden Nierenschadens insbesondere der Proteinurie zu spielen. Beim Menschen wird eine Proteinurie über 800mg am Tag und eine GFR unter 40 ml/min vor Konversion mit einer schlechteren Nierenfunktion nach Konversion in Verbindung gebracht [45]. Die Wirkung der mTOR Inhibitoren insbesondere von Everolimus ist daher im Tierversuch an unterschiedlichen Schädigungsmustern der Niere getestet worden. Daniel et al. untersuchten im anti-Thy1 Glomerulonephritismodell der Ratte den Einfluss von Everolimus in unterschiedlicher Dosierung und zu unterschiedlichen Zeitpunkten [1]. In diesem Modell kommt es nach einer initialen ein- bis zweitägigen mesangiolytischen Phase mit maximaler Einwanderung inflammatorischer Zellen zu einer Phase mesangialer Zellproliferation mit Akkumulation extrazellulärer Matrix, die ca. 3 - 14 Tage andauert. Die in dieser Studie verwendete höhere Dosis von 3 mg/kg Körpergewicht führte zu einer hohen Mortalität und einer Verschlechterung der Nierenfunktion, die histologisch mit einer signifikanten Glomerulosklerose und interstitiellen Fibrose einherging. Des Weiteren verzögerte die Everolimusbehandlung die Rückbildung von kapillären Mikroaneurysmen, die sich in diesem Modell als Folge der glomerulären Endothelverletzung ausbilden. In einer niedrigeren Dosis von 0,3 mg/Kg Körpergewicht war der histologische Nierenschaden fast gänzlich

auf das Mesangium beschränkt und es traten keine Veränderungen der glomerulären Architektur auf. Daniel et al. schlussfolgerten eine Schlüsselrolle der endothelialen Schädigung in der Entwicklung der Nierenfunktionsverschlechterung durch Everolimusgabe. Faktoren, die entscheidend für das Auftreten einer Verschlechterung der Nierenfunktion zu sein scheinen, sind in diesem Modell die Zeit vom Beginn der Schädigung bis zur ersten Everolimusgabe, die Dosis und das Ausmaß der Nierenschädigung mit Beteiligung des glomerulären Endothels. Krämer et al. konnten im anti-Thy1 Glomerulonephritismodell der Ratte für die chronische Phase nach Tag 10 der Antikörperinjektion einen positiven Einfluss auf den Krankheitsverlauf hinsichtlich dem Fortschreiten der Glomerulosklerose, der tubulointerstitiellen Fibrose und der Niereninsuffizienz durch die Gabe von Sirolimus beschreiben [46].

In einem Tiermodell der thrombotischen Mikroangiopathie, das ein vorwiegend endotheliales Schädigungsmuster aufweist, konnte eine Verzögerung der endothelialen Reparaturmechanismen gezeigt werden, die sich aber nicht negativ auf die Mortalität und die Nierenfunktion auswirkte [47]. Eine deutliche Inhibition der VEGF Expression wurde in diesem Modell ebenfalls beobachtet, was als zusätzlicher Mechanismus der verzögerten endothelialen Heilung zur antiproliferativen Wirkungsweise von mTOR Inhibitoren gewertet wurde. Diese Untersuchung erweiterte das Modell der additiven Nierenschädigung durch Everolimus durch die Beobachtung, dass nicht das Muster der Nierenschädigung per se, sondern das Ausmaß der Beteiligung der glomerulären Architektur entscheidend für die Prognose zu sein scheint.

Griffin et al. untersuchten zwei unterschiedliche Niereninsuffizienzmodelle der Ratte auf Unterschiede in der Entwicklung einer systolischen arteriellen Hypertonie, dem Ausmaß der Glomerulosklerose und der renalen Reninexpression [32]. Interessanterweise führte nur die 5/6 Nephrektomie durch Ligation einzelner Äste der A. renalis und nicht die Exzision beider Nierenpole zur kurzfristigen Erhöhung des systolischen arteriellen Blutdruckes einhergehend mit einer Glomerulosklerose und einer initial erhöhten Reninexpression. Diese erhöhte Reninexpression der nichtinfarzierten Nierenanteile scheint für das Ausmass der systemischen arteriellen Hypertonie in der initialen Phase entscheidend zu sein, wobei für die Aufrechterhaltung der Hypertonie im Anschluss an diese Phase andere Mechanismen wie beispielsweise eine Volumenbelastung eine Rolle zu spielen scheinen. Die von Griffin et al. untersuchten Tiere wiesen des Weiteren in Mikropunktionsstudien einzelner Nephrone keine Unterschiede hinsichtlich der glomerulären Filtrationsrate und des Plasmaflusses auf. In weiteren Untersuchungen konnten Griffin et al. die systemische arterielle Hypertonie, das Ausmaß der Übertragung dieser systemischen Hypertonie auf das kapilläre Organbett und die lokale Suszeptibilität des Gewebes auf ein Barotrauma als Faktoren der Organfunktionsverschlechterung der hypertensiven renalen Schädigung ausmachen [33]. Unter physiologischen Voraussetzungen verhindert die Autoregulation der präglomerulären Gefäße als primärer Schutzmechanismus die Weiterleitung eines episodisch oder längerfristigem Blutdruckanstiegs auf

das renale Gefäßsystem. Dadurch ist eine relativ konstante Aufrechterhaltung des renalen Blutflusses und des glomerulären hydrostatischen Druckes gewährleistet. Sobald sich aber das Niveau des systemischen Blutdruckes oberhalb der autoregulatorischen Kapazität der Niere befindet, kommt es unabhängig von der Intaktheit der Autoregulation zu einer renalen Schädigung. Der Schwellenwert des schädigenden Blutdruckniveaus ist dabei bei vorbestehenden Nierenerkrankungen generell niedriger, da eine vorbestehende vaskuläre Schädigung die autoregulatorische Reaktion beeinträchtigen und diese dadurch selbst die renale Schädigung potenzieren kann [48].

Vogelbacher et al. untersuchten den Einfluss der Everolimusgabe auf den Blutdruck und die Nierenfunktion an einem 5/6 Nephrektomiemodell durch Infarzierung und begannen mit der Everolimusgabe am 3. Tag nach Ligation [34]. In dieser Untersuchung zeigte sich zwar ebenfalls eine erhöhte Mortalität und eine Verschlechterung der Nierenfunktion jedoch kein Anstieg des systemischen arteriellen Blutdruckes, so dass von einer teilweise blutdruckunabhängigen Schädigung ausgegangen werden kann.

Diekmann et al. untersuchten den Einfluss von Sirolimus auf die Nierenfunktion und die VEGF Expression an einem 5/6 Nephrektomiemodell durch Kryoablation [49] und begannen 6 Wochen nach Kryoablation und mit dem Einsetzen der Proteinurie die Behandlung mit Sirolimus. Es zeigte sich unter Behandlung eine Verminderung der Proteinurie und eine histologisch weniger stark ausgeprägte Nierenschädigung verglichen mit der unbehandelten Kontrollgruppe. Des Weiteren konnte die Aktivierung des VEGF Systems, gemessen an der VEGF Konzentration im Serum, abgeschwächt werden. Diese Befunde sind jedoch mit den hier erhobenen Daten schwer vergleichbar, da die Behandlung mit einem mTOR Inhibitor zu einem späteren Zeitpunkt erfolgte und unterschiedliche Reparatur- und Adaptationsmechanismen für die frühe und späte Phase nach 5/6 Nephrektomie postuliert werden [50] [51]. Im hier verwendeten Nephrektomiemodell wurde am Tag 1 nach Nephrektomie mit der Behandlung mit Everolimus begonnen. Es zeigte sich nach 4 Wochen kein signifikanter Unterschied im Ausmaß der Proteinurie im Vergleich mit der nephrektomierten Kontrollgruppe, jedoch eine signifikant erniedrigte Kreatinin-Clearance der Ehoch Gruppe. Übereinstimmend mit diesen Beobachtungen zeigen sich die Ergebnisse von Nakagawa et al. [52], die im selben Nephrektomiemodell Everolimus mit 2,0 mg/kg Körpergewicht in einer ähnlichen Dosierung wie der Ehoch Gruppe verabreichten, jedoch im Unterschied zu der hier durchgeführten Untersuchung mit der Gabe nach 2 und nach 8 Wochen begannen. Auch hier kam es zu einer Abnahme der Kreatinin-Clearance einhergehend mit erhöhten Serumharnstoffkonzentrationen unter Everolimusgabe. Rovira et al. untersuchten in einem Kryoablationsmodell der Ratte die präventive Gabe von Sirolimus auf die Entwicklung einer glomerulären Hypertrophie und Proteinurie und begannen mit der Gabe von Sirolimus 7 Tage vor und 12 Wochen nach Nephrektomie [53]. Es zeigte sich kein Einfluss der Behandlung mit Sirolimus auf die

Nierenfunktion, jedoch liess sich die Ausbildung der glomerulären Hypertrophie durch eine frühzeitige mTOR Inhibition beeinflussen.

Die unterschiedlichen Beobachtungen der einzelnen Autoren hinsichtlich des Einflusses einer mTOR Inhibition nach Nierenschädigung scheinen mit dem Zeitpunkt des Behandlungsbeginnes bzw. dem Krankheitsstadium sowie der Art und dem Ausmaß des initialen Nierenschadens zusammenzuhängen und zudem dosisabhängig zu sein.

## 6.4 COX2 und VEGF Expression

Die corticale Expression der Cyclooxygenase-2 Isoform ist bei gesunden adulten Ratten niedrig, im angewandten 5/6 Nephrektomiemodell der Ratte kommt es jedoch zu einem selektiven Anstieg der COX2 Expression in macula densa Zellen, Podozyten und der pars recta des distalen Tubulus [54]. Die zugrunde liegenden Mechanismen hierfür sind bislang unklar. Vasodilatatorische Prostaglandine wie das Prostaglandin E<sub>2</sub>, welches durch die Cyclooxygenase-2 synthetisiert wird, scheinen ursächlich mit der Entwicklung der Nierenfunktionsveränderung verknüpft zu sein. Sanchez et al. konnten eine Abschwächung der Nierenfunktionsverschlechterung in der ersten Woche nach 5/6 Nephrektomie durch selektive Hemmung der COX2 Expression durch den spezifischen Inhibitor NS-398 zeigen [55].

Sowohl hämodynamische als auch inflammatorische Mechanismen sind an der Pathogenese des chronischen Nierenversagens beteiligt. Kong et al. zeigten einen Vorteil der Kombination einer Blockade des Renin- Angiotensin-Aldosteron Systems (RAAS) und einer COX2 Inhibierung im 5/6 Nephrektomiemodell der Ratte gegenüber einer Einzelgabe [56]. Ebenso konnte in unabhängigen Arbeiten eine stärkere Nephroprotektion durch die Kombination einer RAAS Blockade mit einer immunsuppressiven Substanz (Mycophenolat, Tacrolimus) im 5/6 Nephrektomiemodell gezeigt werden [57]. Im hier angewandten 5/6 Nephrektomiemodell zeigte sich nach 4 Wochen immunsuppressiver Behandlung einzig in der CyA Gruppe eine Erhöhung der COX-2 mRNA Expression.

Der Vascular endothelial growth factor (VEGF) stimuliert u.a. die endotheliale Zellproliferation, vermittelt die endothelabhängige Vasodilatation, induziert eine mikrovaskuläre Hyperpermeabilität und beeinflusst die Zusammensetzung der extrazellulären Matrix [58]. VEGF und der VEGF Rezeptor werden kontinuierlich in der Niere exprimiert und spielen eine Schlüsselrolle in unterschiedlichen pathophysiologischen Zuständen [50]. Im angewandten 5/6 Nephrektomiemodell der Ratte ist für die frühe glomeruläre Hypertrophie eine vermehrte VEGF Expression beschrieben [51], wobei eine verminderte VEGF Expression mit einer verminderten Kapillardichte einhergeht. Piecha et al. untersuchten an einem vergleichbaren

5/6 Nephrektomiemodell männliche Sprague-Dawley Ratten hinsichtlich des Einflusses einer Angiotensin Rezeptor Typ 1 Blockade, einer Mineralocortikoidblockade und deren Kombination auf die Reversibilität einer Glomerulosklerose [59]. 8 Wochen postoperativ zeigte sich immunhistochemisch eine niedrigere Färbung auf VEGF sowie eine verminderte korticale Expression des Vascular Endothelial Growth Factor. In der durchgeführten Untersuchung konnte 4 Wochen postoperativ keine signifikante Erniedrigung der VEGF Expression der unbehandelten Nx Gruppe beobachtet werden. Die VEGF Expression in den behandelten nephrektomierten Gruppen zeigte sich im Vergleich höher als in der unbehandelten Nx Gruppe, erreichte aber nur in der CyA Gruppe ein signifikantes Niveau. Im Vergleich der behandelten Nx Gruppen zeigte sich eine reziproke Tendenz der VEGF Expression zur beobachteten Proteinurie. Für Everolimus ist eine Inhibition der renalen VEGF Expression im anti-Thy1 Glomerulonephritismodell beschrieben [60], wobei der Zeitpunkt der Gabe entscheidend für das Auftreten einer Verschlechterung der Nierenfunktion zu sein scheint.

## 7 Zusammenfassung

Unter hoher Everolimusdosierung wurde eine erhöhte Mortalität beobachtet. Everolimus führte in hoher Dosis zu einer Nierenschädigung mit Abnahme der Kreatinin-Clearance im nichtinflammatorischen Modell der 5/6 nephrektomierten Ratte. Es kam zu keiner signifikanten Veränderung der Proteinurie und Albuminurie.

## 8 Literatur

### Literatur

- [1] C Daniel, L Renders, K Amann, E Schulze-Lohoff, I A Hauser, and C Hugo. Mechanisms of everolimus-induced glomerulosclerosis after glomerular injury in the rat. *Am J Transplant*, 5(12):2849–2861, Dec 2005.
- [2] D. D. Savage, J. I. Drayer, W. L. Henry, E. C. Mathews, J. H. Ware, J. M. Gardin, E. R. Cohen, S. E. Epstein, and J. H. Laragh. Echocardiographic assessment of cardiac anatomy and function in hypertensive subjects. *Circulation*, 59(4):623–632, Apr 1979.
- [3] R. B. Devereux, G. de Simone, A. Ganau, M. J. Koren, G. A. Mensah, and M. J. Roman. Left ventricular hypertrophy and hypertension. *Clin. Exp. Hypertens.*, 15(6):1025–1032, Nov 1993.

- [4] H. Brunner, J. R. Cockcroft, J. Deanfield, A. Donald, E. Ferrannini, J. Halcox, W. Kiowski, T. F. Luscher, G. Mancina, A. Natali, J. J. Oliver, A. C. Pessina, D. Rizzoni, G. P. Rossi, A. Salvetti, L. E. Spieker, S. Taddei, and D. J. Webb. Endothelial function and dysfunction. Part II: Association with cardiovascular risk factors and diseases. A statement by the Working Group on Endothelins and Endothelial Factors of the European Society of Hypertension. *J. Hypertens.*, 23(2):233–246, Feb 2005.
- [5] E. Ingelsson, P. Gona, M. G. Larson, D. M. Lloyd-Jones, W. B. Kannel, R. S. Vasan, and D. Levy. Altered blood pressure progression in the community and its relation to clinical events. *Arch. Intern. Med.*, 168(13):1450–1457, Jul 2008.
- [6] A. K. Bidani and K. A. Griffin. Pathophysiology of hypertensive renal damage: implications for therapy. *Hypertension*, 44(5):595–601, Nov 2004.
- [7] A. M. Marney and N. J. Brown. Aldosterone and end-organ damage. *Clin. Sci.*, 113(6):267–278, Sep 2007.
- [8] C. G. Brilla, G. P. Reams, B. Maisch, and K. T. Weber. Renin-angiotensin system and myocardial fibrosis in hypertension: regulation of the myocardial collagen matrix. *Eur. Heart J.*, 14 Suppl J:57–61, Nov 1993.
- [9] C. G. Brilla, B. Maisch, and K. T. Weber. Renin-angiotensin system and myocardial collagen matrix remodeling in hypertensive heart disease: in vivo and in vitro studies on collagen matrix regulation. *Clin Investig*, 71(5 Suppl):35–41, 1993.
- [10] M. Yuan, M. Ohishi, L. Wang, H. Raguki, H. Wang, L. Tao, and J. Ren. Association between serum levels of soluble CD40/CD40 ligand and organ damage in hypertensive patients. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.*, 37(8):848–851, Aug 2010.
- [11] D. G. Harrison, A. Vinh, H. Lob, and M. S. Madhur. Role of the adaptive immune system in hypertension. *Curr Opin Pharmacol*, 10(2):203–207, Apr 2010.
- [12] B. L. Kasiske, S. Anjum, R. Shah, J. Skogen, C. Kandaswamy, B. Danielson, E. A. O’Shaughnessy, D. C. Dahl, J. R. Silkensen, M. Sahadevan, and J. J. Snyder. Hypertension after kidney transplantation. *Am. J. Kidney Dis.*, 43(6):1071–1081, Jun 2004.
- [13] L. Liefeldt and K. Budde. Risk factors for cardiovascular disease in renal transplant recipients and strategies to minimize risk. *Transpl. Int.*, 23(12):1191–1204, Dec 2010.
- [14] E. Paoletti, M. Gherzi, M. Amidone, F. Massarino, and G. Cannella. Association of arterial hypertension with renal target organ damage in kidney transplant recipients: the predictive role of ambulatory blood pressure monitoring. *Transplantation*, 87(12):1864–1869, Jun 2009.

- [15] D. Hernandez. Left ventricular hypertrophy after renal transplantation: new approach to a deadly disorder. *Nephrol. Dial. Transplant.*, 19(7):1682–1686, Jul 2004.
- [16] V. Audard, M. Matignon, F. Hemery, R. Snanoudj, P. Desgranges, M. C. Anglade, H. Kobeiter, A. Durrbach, B. Charpentier, P. Lang, and P. Grimbert. Risk factors and long-term outcome of transplant renal artery stenosis in adult recipients after treatment by percutaneous transluminal angioplasty. *Am. J. Transplant.*, 6(1):95–99, Jan 2006.
- [17] J. Vella, D. Brennan, B. Murphy, G. Bakris, and T. Post. Hypertension after renal transplantation. *UptoDate Review*, Dec 2010.
- [18] F. Romero, B. Rodriguez-Iturbe, G. Parra, L. Gonzalez, J. Herrera-Acosta, and E. Tapia. Mycophenolate mofetil prevents the progressive renal failure induced by 5/6 renal ablation in rats. *Kidney Int.*, 55(3):945–955, Mar 1999.
- [19] B. M. Shrestha and J. Haylor. Biological pathways and potential targets for prevention and therapy of chronic allograft nephropathy. *Biomed Res Int*, 2014:482438, 2014.
- [20] V. W. Lee and J. R. Chapman. Sirolimus: its role in nephrology. *Nephrology (Carlton)*, 10(6):606–614, Dec 2005.
- [21] C. Dunn and K. F. Croom. Everolimus: a review of its use in renal and cardiac transplantation. *Drugs*, 66(4):547–570, 2006.
- [22] J. Averous and C. G. Proud. When translation meets transformation: the mTOR story. *Oncogene*, 25(48):6423–6435, Oct 2006.
- [23] Y. Takeda, I. Miyamori, P. Wu, T. Yoneda, K. Furukawa, and R. Takeda. Effects of an endothelin receptor antagonist in rats with cyclosporine-induced hypertension. *Hypertension*, 26(6 Pt 1):932–936, Dec 1995.
- [24] O. Viklicky, H. Zou, V. Muller, J. Lacha, A. Szabo, and U. Heemann. SDZ-RAD prevents manifestation of chronic rejection in rat renal allografts. *Transplantation*, 69(4):497–502, Feb 2000.
- [25] M. Deters, G. Kirchner, T. Koal, K. Resch, and V. Kaefer. Everolimus/cyclosporine interactions on bile flow and biliary excretion of bile salts and cholesterol in rats. *Dig. Dis. Sci.*, 49(1):30–37, Jan 2004.
- [26] K. Hocherl, C. Hensel, B. Ulbricht, and B. K. Kramer. Everolimus treatment downregulates renocortical cyclooxygenase-2 expression in the rat kidney. *Br. J. Pharmacol.*, 145(8):1112–1122, Aug 2005.

- [27] H. Podder, S. M. Stepkowski, K. L. Napoli, J. Clark, R. R. Verani, T. C. Chou, and B. D. Kahan. Pharmacokinetic interactions augment toxicities of sirolimus/cyclosporine combinations. *J. Am. Soc. Nephrol.*, 12(5):1059–1071, May 2001.
- [28] J. Rovira, E. Marcelo Arellano, J. T. Burke, Y. Brault, D. Moya-Rull, E. Banon-Maneus, M. J. Ramirez-Bajo, A. Gutierrez-Dalmau, I. Revuelta, L. F. Quintana, J. M. Campistol, and F. Diekmann. Effect of mTOR inhibitor on body weight: from an experimental rat model to human transplant patients. *Transpl. Int.*, 21(10):992–998, Oct 2008.
- [29] D. Cota, K. Proulx, K. A. Smith, S. C. Kozma, G. Thomas, S. C. Woods, and R. J. Seeley. Hypothalamic mTOR signaling regulates food intake. *Science*, 312(5775):927–930, May 2006.
- [30] F. Diekmann, J. M. Campistol, J. Rovira, K. Budde, H. H. Neumayer, F. Oppenheimer, and S. M. Flechner. Treatment with sirolimus is associated with less weight gain after kidney transplantation. *Transplantation*, 96(5):480–486, Sep 2013.
- [31] M. Güray, S. Sarioglu, M. Türkmen, O. Yilmaz, H. Ellidokuz, A. Gelal, H. Islekel, A. Coker, and E. Ozer. Cyclosporine A toxicity in association with reduced renal mass. *Transplant. Proc.*, 35:3128–3133, Dec 2003.
- [32] K. A. Griffin, M. M. Picken, M. Churchill, P. Churchill, and A. K. Bidani. Functional and structural correlates of glomerulosclerosis after renal mass reduction in the rat. *J. Am. Soc. Nephrol.*, 11(3):497–506, Mar 2000.
- [33] A. K. Bidani, K. A. Griffin, M. Picken, and D. M. Lansky. Continuous telemetric blood pressure monitoring and glomerular injury in the rat remnant kidney model. *Am. J. Physiol.*, 265(3 Pt 2):F391–398, Sep 1993.
- [34] R. Vogelbacher, S. Wittmann, A. Braun, C. Daniel, and C. Hugo. The mTOR inhibitor everolimus induces proteinuria and renal deterioration in the remnant kidney model in the rat. *Transplantation*, 84(11):1492–1499, Dec 2007.
- [35] M. O. Boluyt, Z. B. Li, A. M. Loyd, A. F. Scalia, G. M. Cirrincione, and R. R. Jackson. The mTOR/p70S6K signal transduction pathway plays a role in cardiac hypertrophy and influences expression of myosin heavy chain genes in vivo. *Cardiovasc Drugs Ther*, 18(4):257–267, Jul 2004.
- [36] O. J. Kemi, M. Ceci, U. Wisloff, S. Grimaldi, P. Gallo, G. L. Smith, G. Condorelli, and O. Ellingsen. Activation or inactivation of cardiac Akt/mTOR signaling diverges physiological from pathological hypertrophy. *J. Cell. Physiol.*, 214(2):316–321, Feb 2008.

- [37] W. H. Shen, Z. Chen, S. Shi, H. Chen, W. Zhu, A. Penner, G. Bu, W. Li, D. W. Boyle, M. Rubart, L. J. Field, R. Abraham, E. A. Liechty, and W. Shou. Cardiac restricted overexpression of kinase-dead mammalian target of rapamycin (mTOR) mutant impairs the mTOR-mediated signaling and cardiac function. *J. Biol. Chem.*, 283(20):13842–13849, May 2008.
- [38] Benjamin J Wilkins and Jeffery D Molkentin. Calcium-calcineurin signaling in the regulation of cardiac hypertrophy. *Biochem Biophys Res Commun*, 322(4):1178–1191, Oct 2004.
- [39] B. Fiedler and K. C. Wollert. Interference of antihypertrophic molecules and signaling pathways with the Ca<sup>2+</sup>-calcineurin-NFAT cascade in cardiac myocytes. *Cardiovasc. Res.*, 63(3):450–457, Aug 2004.
- [40] P. H. Goldspink, R. D. McKinney, V. A. Kimball, D. L. Geenen, and P. M. Buttrick. Angiotensin II induced cardiac hypertrophy in vivo is inhibited by cyclosporin A in adult rats. *Mol. Cell. Biochem.*, 226(1-2):83–88, Oct 2001.
- [41] E. Oie, R. Bjornerheim, O. P. Clausen, and H. Attramadal. Cyclosporin A inhibits cardiac hypertrophy and enhances cardiac dysfunction during postinfarction failure in rats. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, 278(6):H2115–2123, Jun 2000.
- [42] C Fleck. Determination of the glomerular filtration rate (GFR): methodological problems, age-dependence, consequences of various surgical interventions, and the influence of different drugs and toxic substances. *Physiol Res*, 48(4):267–279, 1999.
- [43] J. Beige, R. Kreutz, and L. Rothermund. [Acute renal failure: pathophysiology and clinical management]. *Dtsch. Med. Wochenschr.*, 132(48):2569–2578, Nov 2007.
- [44] J.C. Ruiz, J.M. Campistol, A. Sánchez-Fructuoso, C. Rivera, J. Oliver, D. Ramos, B. Campos, M. Arias, and F. Diekmann. Increase of proteinuria after conversion from calcineurin inhibitor to sirolimus-based treatment in kidney transplant patients with chronic allograft dysfunction. *Nephrol. Dial. Transplant.*, 21:3252–3257, Nov 2006.
- [45] F. Diekmann, K. Budde, F. Oppenheimer, L. Fritsche, H. H. Neumayer, and J. M. Campistol. Predictors of success in conversion from calcineurin inhibitor to sirolimus in chronic allograft dysfunction. *Am J Transplant*, 4(11):1869–1875, Nov 2004. Clinical Trial.
- [46] S. Kramer, Y. Wang-Rosenke, V. Scholl, E. Binder, T. Loof, D. Khadzhyonov, H. Kawachi, F. Shimizu, F. Diekmann, K. Budde, H. H. Neumayer, and H. Peters. Low-dose mTOR inhibition by rapamycin attenuates progression in anti-thy1-induced chronic glomerulosclerosis of the rat. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.*, 294(2):F440–449, Feb 2008.

- [47] Katja Keller, Christoph Daniel, Harald Schocklmann, Karl-Hans Endlich, Donscho Kerjaschki, Richard J Johnson, and Christian Hugo. Everolimus inhibits glomerular endothelial cell proliferation and VEGF, but not long-term recovery in experimental thrombotic microangiopathy. *Nephrol Dial Transplant*, 21(10):2724–2735, Oct 2006.
- [48] A. Schieppati and G. Remuzzi. The June 2003 Barry M. Brenner Comgan lecture. The future of renoprotection: frustration and promises. *Kidney Int.*, 64(6):1947–1955, Dec 2003.
- [49] F. Diekmann, J. Rovira, J. Carreras, E. M. Arellano, E. Banon-Maneus, M. J. Ramirez-Bajo, A. Gutierrez-Dalmau, M. Brunet, and J. M. Campistol. Mammalian target of rapamycin inhibition halts the progression of proteinuria in a rat model of reduced renal mass. *J. Am. Soc. Nephrol.*, 18(10):2653–2660, Oct 2007.
- [50] B. F. Schrijvers, A. Flyvbjerg, and A. S. De Zeeuw. The role of vascular endothelial growth factor (VEGF) in renal pathophysiology. *Kidney Int.*, 65(6):2003–2017, Jun 2004.
- [51] D. H. Kang, A. H. Joly, S. W. Oh, C. Hugo, D. Kerjaschki, K. L. Gordon, M. Mazzali, J. A. Jefferson, J. Hughes, K. M. Madsen, G. F. Schreiner, and R. J. Johnson. Impaired angiogenesis in the remnant kidney model: I. Potential role of vascular endothelial growth factor and thrombospondin-1. *J. Am. Soc. Nephrol.*, 12(7):1434–1447, Jul 2001.
- [52] S. Nakagawa, S. Masuda, K. Nishihara, and K. Inui. mTOR inhibitor everolimus ameliorates progressive tubular dysfunction in chronic renal failure rats. *Biochem. Pharmacol.*, 79(1):67–76, Jan 2010.
- [53] J. Rovira, E. M. Arellano, J. Carreras, B. Campos, B. Vodenik, E. Banon-Maneus, M. J. Ramirez-Bajo, D. Moya-Rull, A. Sole-Gonzalez, A. Hernandez, I. Revuelta, L. F. Quintana, W. J. Howat, J. M. Campistol, and F. Diekmann. Mammalian target of rapamycin inhibition prevents glomerular hypertrophy in a model of renal mass reduction. *Transplantation*, 88(5):646–652, Sep 2009.
- [54] J L Wang, H F Cheng, M Z Zhang, J A McKanna, and R C Harris. Selective increase of cyclooxygenase-2 expression in a model of renal ablation. *Am J Physiol*, 275(4 Pt 2):613–622, Oct 1998.
- [55] P. L. Sanchez, L. M. Salgado, N. R. Ferreri, and B. Escalante. Effect of cyclooxygenase-2 inhibition on renal function after renal ablation. *Hypertension*, 34(4 Pt 2):848–853, Oct 1999.
- [56] W. X. Kong, J. Ma, Y. Gu, H. C. Yang, Y. Q. Zuo, and S. Y. Lin. [Renal protective effects of specific cyclooxygenase-2 inhibitor in rats with subtotal renal ablation]. *Zhonghua Nei Ke Za Zhi*, 42(3):186–190, Mar 2003.

- [57] P. Hamar, J. Peti-Peterdi, Z. Razga, G. Kovacs, U. Heemann, and L. Rosivall. Coinhibition of immune and renin-angiotensin systems reduces the pace of glomerulosclerosis in the rat remnant kidney. *J. Am. Soc. Nephrol.*, 10 Suppl 11:S234–238, Jan 1999.
- [58] N. Ferrara. Role of vascular endothelial growth factor in regulation of physiological angiogenesis. *Am. J. Physiol., Cell Physiol.*, 280(6):C1358–1366, Jun 2001.
- [59] G. Piecha, N. Koleganova, M. L. Gross, A. Geldyyev, M. Adamczak, and E. Ritz. Regression of glomerulosclerosis in subtotaly nephrectomized rats: effects of monotherapy with losartan, spironolactone, and their combination. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.*, 295(1):F137–144, Jul 2008.
- [60] S. Wittmann, C. Daniel, A. Braun, R. Vogelbacher, F. Shimizu, H. Kawachi, and C. Hugo. The mTOR inhibitor everolimus attenuates the time course of chronic anti-Thy1 nephritis in the rat. *Nephron Exp. Nephrol.*, 108(2):45–56, 2008.

## 9 Eidesstattliche Versicherung

## Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Marcel Haug, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Einfluss der Immunsuppression auf die Progredienz der Niereninsuffizienz im Modell der 5/6 nephrektomierten Ratte“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -[www.icmje.org](http://www.icmje.org)) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Betreuer/in, angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

Unterschrift

### Anteilerklärung an etwaigen erfolgten Publikationen

[Marcel Haug] hatte folgenden Anteil an den folgenden Publikationen:

Haug M., Kneifel M., Ba\_e M., Zidek W., Kreutz R., Rothermund L., Everolimus impairs renal function in a 5/6 renal ablation rat model, Vortrag, Hypertonie 2006, Deutsche Hochdruck Liga

Beitrag im Einzelnen (bitte kurz ausführen):

Verfasst und vorgetragen.

Unterschrift, Datum und Stempel des betreuenden Hochschullehrers

Unterschrift des Doktoranden

## 10 Lebenslauf/Publicationen

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

# LEBENS LAUF

MARCEL BERNHARD OTTO HAUG

---

---

---

---

---

---

---

---

---

## VERÖFFENTLICHUNGEN

Rothermund L, Lorenz M, Schnieber A, Ebersson J, Bauhaus I, Bernhard Haug M, Schulz A, Keller F, Vetter R, Kreutz R., Impact of Nephron Number Dosing on Cardiorenal Damage and Effects of ACE Inhibition, Am J Hypertens. 2010 Sep 23

Short-term treatment with a beta-blocker with vasodilative capacities improves intrarenal endothelial function in experimental renal failure. Gschwend S, Haug MB, Nierhaus M, Schulz A, Vetter R, Kossmehl P, Orzechowski HD, Scholze J, Rothermund L, Kreutz R, Life Sci. 2009 Sep 9;85(11-12):431-7. Epub 2009 Jul 2

Haug M., Kneifel M., Baé M., Zidek W., Kreutz R., Rothermund L., Everolimus impairs renal function in a 5/6 renal ablation rat model, Vortrag, Hypertonie 2006, Deutsche Hochdruck Liga

Nierhaus M., Gschwend S., Haug M., Rothermund L., Kreutz R., Coronary endothelial function in the 5/6 Nx rat model of chronic renal failure - effect of the NO releasing beta blocker nebivolol, Poster, Hypertonie 2006, Deutsche Hochdruck Liga

Stoeter K., Haug M., Ruehl M., Somasundaram R., Matrix as a modulator of hepatic fibrogenesis: Fragmente von Kollagen VI und XIV als Ausgangspunkte einer antifibrotischen Therapie, Poster, Benjamin Franklin Kolleg II 2005

Radbruch C., Haug M., Taher M., Al Hussein K., Rühl M., Somasundaram R., Kollagen nur Bindegewebe oder mehr?, Vortrag, Benjamin Franklin Kolleg I 2003

## 11 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich all jenen danken, die mich bei meiner Promotion unterstützt haben. Insbesondere Herrn PD. Dr. Lars Rothermund für die Förderung, die geduldige Zusammenarbeit und die Möglichkeit jederzeit eigene Ideen in die Arbeit einbringen zu können. Herrn Prof. Dr. Reinhold Kreutz danke ich für die vielen Anregungen und das klare strukturierend ordnende Heranbringen an wissenschaftliche Fragestellungen. Dr. Markus Wehland-von Trebra und Dr. Juliane Bohlbrinker für ihre Hilfe und Unterstützung. Meiner Kommilitonin Miriam Baé für ihre organisatorische Hilfestellung und die gute kollegiale Zusammenarbeit. Meinen Eltern bin ich für alles sehr dankbar.