

4. Zusammenfassung

Um den möglichen Zusammenhang eines erhöhten ET-Spiegels mit der essentiellen Hypertonie zu untersuchen, wurden von der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. F. Theuring, Institut für Pharmakologie und Toxikologie, Universitätsklinikum Charité, Humboldt Universität Berlin, human ET-1-transgene Mäuse etabliert und in der AG PD Dr. Hocher charakterisiert. Dabei hatten die Tiere jedoch nicht wie erwartet einen erhöhten Blutdruck, sondern waren normotensiv. Bei weiteren Untersuchungen fand man an den Nieren altersabhängig Nierenzysten, eine Glomerulosklerose und eine interstitielle Fibrose (Hocher et al. 1997b). In der Lunge fand man ebenfalls eine Fibrose und chronisch inflammatorische Veränderungen (Hocher et al. 2000a). Beim ersten Vergleich der Gewichte der entnommenen Organe stellte sich ein signifikanter Unterschied im absoluten und im auf das Körpergewicht bezogenen relativen Gehirngewicht heraus. Die Gehirne der transgenen Tiere waren dabei leichter als die der Kontrolltiere, so dass die in Paraffin eingebetteten Gehirne zur weiteren Untersuchung an das Institut für Neuropathologie des Universitäts Klinikum Benjamin Franklin gegeben wurden.

Um festzustellen, in welchen Gehirnbereichen eine Expression des ET-1-Transgens stattfindet, wurden Gehirne von LacZ-Tieren, die wir ebenfalls von der AG PD Dr. Hocher erhalten haben, untersucht. Bei den LacZ-Tieren befindet sich hinter der Promotorregion des ET-1-Gens im Bereich des ersten Exons das bakterielle β -Galaktosidasegen (=LacZ-Gen). Diese Lokalisation des LacZ-Gens führt zu einem Kettenabbruch bei der Synthese des transgenen ET-1, so dass bei diesen Tieren keine erhöhte ET-1-Expression vorliegt (Slowinski et al. 2002). Die Expression des β -Galaktosidasegens wurde durch die Markierung mit 5-bromo-3-indolyl- β -D-galactopyranosid (=Bluo-Gal) sichtbar gemacht, was zu einer Bildung von intrazellulären blauen Präzipitaten führt. Die Blaufärbung zeigte sich in Neuronen im Hirnstamm, im piriformen Kortex, in den Kerngebieten des Hypothalamus und Thalamus, im frontalen Kortex, in den Kerngebieten des Kleinhirns, sowie in geringerem Ausmaß auch im parietalen Kortex, in den Basalganglien, im Bereich der Commissura anterior und im Corpus amygdaloideum. Diese Lokalisation der ET-1-Expression liegt im Einklang mit den Ergebnissen anderer Studien, die ebenfalls unter anderem in diesen Bereichen eine ET-1-Expression nachweisen konnten (Giaid et al. 1991, Naidoo et al. 2001, Naidoo et al. 2004).

Die in dieser Studie verwendeten Gehirne lassen sich je nach Behandlung in 6 Gruppen einteilen:

Gruppe 1: mit L-Name behandelte, transgene Tiere

Gruppe 2: mit L-Name und LU 224 behandelte, transgene Tiere

Gruppe 3: unbehandelte, transgene Tiere

Gruppe 4: mit L-Name behandelte Kontrolltiere

Gruppe 5: mit L-Name und LU 224 behandelte Kontrolltiere

Gruppe 6: unbehandelte Kontrolltiere

L-Name ist ein NO-Synthase-Antagonist, der zur Hemmung der Gegenregulation durch das NO-System gegeben wurde. LU224 ist ein kombinierter ET_A R/ ET_B R-Antagonist, der gegeben wurde, um zu sehen, ob die bei den L-Name behandelten, transgenen Tieren beobachteten Veränderungen auch wirklich durch die ET-1-Überexpression verursacht wurden.

Die Gehirne wurden geschnitten und HE- und Luxolgefärbt, sowie mit GFAP und Tomato Lektin markiert. Bei den ersten lichtmikroskopischen Untersuchungen konnte zwischen den Neuronen und Markscheiden der transgenen Tiere im Vergleich zu den Kontrolltieren kein

Unterschied gefunden werden. Bei der Astroglia und der Mikroglia wurde ein leichter Unterschied vermutet. Zudem reagieren Astrozyten (O'Callaghan 1988 und 1991) und Mikrogliazellen (Banati 2003) sehr sensibel auf schädigende Einflüsse, so dass sich Veränderungen zuerst an diesen Zellen zeigen. Eine der Fibrose in anderen Organen ähnliche Veränderung würde sich im Gehirn durch Veränderungen der Astrozyten in Form einer Astrogliose äußern, eine inflammatorische ZNS-Schädigung durch eine Aktivierung der Mikroglia. Da auch in den Nieren und Lungen der transgenen Tiere eine Fibrose und inflammatorische Veränderungen festgestellt wurden (Hocher et al. 1997b, Hocher et al. 2000a), konzentrierten sich die weiteren Untersuchungen auf die Astrozyten und Mikrogliazellen. Um objektive und reproduzierbare Ergebnisse zu erzielen, wurden die GFAP- und Tomato Lektin-markierten Präparate mit Hilfe des Bildanalyse-Systems Quantimet 570 von der Firma Leica ausgemessen und berechnet. Als auszumessende Gehirnbereiche wurden das Striatum und der Hypothalamus ausgewählt, da in diesen Bereichen eine ET-1-Expression besonders häufig gefunden wurde und auch viele ET-Rezeptoren vorkommen (Tayag et al. 1996, Yamamoto et al. 1997, Webber et al. 1998a, Webber et al. 1998b, Naidoo et al. 2001 und 2004). Bei den LacZ-Tieren war der Hypothalamus ebenfalls häufig blau markiert. Im Striatum fand sich allerdings keine Markierung, was jedoch vermutlich auf eine zu kurze Einwirkzeit zurückzuführen ist, da die Gehirne nur einmal entlang des Hemisphärenspalts geteilt wurden und vor der Bluo-Gal-Markierung nicht weiter geschnitten wurden.

Bei der Auswertung der GFAP-Markierung zeigte sich weder im Hypothalamus noch im Striatum ein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen. Verglichen wurden jeweils:

- die transgenen, unbehandelten Tiere mit den unbehandelten Kontrolltieren
- die mit L-Name behandelten, transgenen Tiere im Vergleich zu den L-Name behandelten Kontrollen
- die mit L-Name und LU224 behandelten, transgenen Tiere im Vergleich zu den mit L-Name und LU224 behandelten Kontrolltieren
- die unbehandelten, transgenen Tiere mit den L-Name behandelten, transgenen Tieren
- die L-Name behandelten, transgenen Tiere mit den L-Name und LU224 behandelten, transgenen Tieren
- die unbehandelten Kontrolltiere mit den L-Name behandelten Kontrolltieren
- die L-Name behandelten Kontrolltiere mit den L-Name und LU224 behandelten Kontrolltieren

Lediglich im Bereich des Striatums zeigte sich ein geringerer GFAP-Gehalt bei den unbehandelten, transgenen Tieren im Vergleich zu den L-Name behandelten, transgenen Tieren von $p=0,012$, was jedoch bei Berücksichtigung der Anzahl der durchgeführten Tests durch Verwendung einer Bonferroni-Korrektur nicht mehr signifikant war. Dennoch könnte es ein Hinweis darauf sein, dass die Hemmung der Gegenregulation durch L-Name zu einer leicht verstärkten Astrogliareaktion geführt hat. Insgesamt war die GFAP-Reaktion bei allen Tieren eher stark ausgeprägt.

Vergleicht man die transgenen Tiere und die Kontrolltiere mit den LacZ-Tieren, so zeigt sich, dass die LacZ-Tiere einen signifikant niedrigeren GFAP-Gehalt haben. Dies zeigte sich vor allem im Striatum und bei den transgenen Tieren auch im Hypothalamus. Bei den Kontrolltieren ließ sich im Hypothalamus ebenfalls eine Tendenz in diese Richtung erkennen. Das deutet darauf hin, dass während der Aufzucht ein schädigender Einfluss vorlag, der auf die transgenen Tiere und die Kontrolltiere in gleichem Ausmaß einwirkte und zu der verstärkten GFAP-Reaktion führte. Normalerweise hätten die LacZ-Tiere eine gleiche oder

stärkere GFAP-Markierung als die anderen Versuchstiere zeigen müssen, da sie älter waren und die GFAP-Reaktion mit dem Alter zunimmt (Nichols et al. 1993). Die genauen Faktoren, die zu der Astrogliose geführt haben, lassen sich im Nachhinein leider nicht mehr erheben. In Frage kommen beispielsweise eine Hypoxie, eine Infektion, vermehrter Stress oder ähnliches. Bei der Auswertung der Tomato Lektin-Markierung konnte mit dem Quantimet ebenfalls kein Unterscheid zwischen den Gruppen gefunden werden. Verglichen wurden auch hier die oben beschriebenen Gruppen. Beim Vergleich mit den LacZ-Tieren zeigt sich ein signifikant höherer Tomato Lektin-Gehalt der LacZ-Tiere. Dies ist jedoch vermutlich auf die deutlich höhere Anzahl an Gefäßanschnitten (da diese auch von Tomato Lektin markiert werden) zurückzuführen, und nicht auf eine vermehrte Mikroglia-Aktivierung. Das Quantimet eignet sich also nicht besonders gut, um geringe Veränderungen in der Mikroglia-Morphologie bei einer Tomato Lektin-Markierung zu erkennen.

Zur genaueren Beurteilung der Mikroglia-Morphologie wurden die Präparate bei stärkeren Vergrößerungen untersucht. Die Kontrolltiere zeigten dabei hauptsächlich ramifizierte Mikrogliazellen mit feinen, verzweigten Fortsätzen. Die Behandlung mit L-Name führte zu einer leicht erhöhten Anzahl der etwas plumperen Zellen mit kürzeren Fortsätzen, solche aktivierten Zellen waren aber immer noch selten zu sehen. Bei der kombinierten Behandlung mit L-Name und LU224 ließen sich ausschließlich ramifizierte Mikrogliazellen nachweisen.

Die unbehandelten, transgenen Tiere zeigten häufiger aktivierte Mikrogliazellen. Vor allem im Hirnstamm und Kleinhirnmarklager, weniger häufig im Hypothalamus und Thalamus, selten auch im Striatum und Kortex waren aktivierte Mikrogliazellen zu finden. Noch ausgeprägter war die Aktivierung bei den L-Name behandelten, transgenen Tieren zu sehen. Die Fortsätze der Mikrogliazellen dieser Tiere waren noch kürzer und dicker, und vereinzelt waren auch Zellnester aus zusammengelagerten Mikrogliazellen zu sehen, ein weiteres deutliches Zeichen für eine Aktivierung. Auch bei diesen Tieren entsprach die Verteilung der aktivierten Mikrogliazellen der bei den unbehandelten, transgenen Tieren beschriebenen. In bestimmten Gehirnbereichen wie dem Hippocampus fanden sich fast nie aktivierte Mikrogliazellen. Bei der kombinierten Behandlung mit L-Name und LU224 zeigten die Mikrogliazellen der transgenen Tiere keine Aktivierung und waren in ramifizierten Zustand. Die Verteilung der aktivierten Mikrogliazellen entspricht in etwa der Verteilung der Bluo-Gal-Markierung der LacZ-Tiere. Das legt die Vermutung nahe, dass die Aktivierung aufgrund der ET-1-Überexpression erfolgte. Dafür spricht auch, dass bei Hemmung des gegenregulatorischen NO-Systems durch L-Name die Aktivierung der Mikrogliazellen noch ausgeprägter ist und bei zusätzlicher Hemmung des ET-Systems durch LU224 keine Aktivierung mehr nachzuweisen ist.