

4 Resultate

4.1 COX-2-Immunfluoreszenz in der Maus

Voraussetzung für die Untersuchung der Expression von COX-2 im JGA der genetisch manipulierten Mäuse war die Etablierung eines Immunoassays für COX-2 in diesen Tieren. Zu diesem Zweck wurden unterschiedliche Modifikationen im Protokoll der entsprechenden Technik (Immunfluoreszenz und Immunhistochemie) an nativem und perfusionsfixiertem Gewebe getestet (Tabelle 12). Eine reproduzierbare Färbung differenzierbarer Macula densa-Zellen an unbehandelten Kontrolltieren war dabei nur mit einem von Cayman Chemicals hergestellten polyklonalen Antikörper nachweisbar. Mit diesem Antikörper war jedoch die Zahl der Zellen, welche pro Schnitt angefärbt wurden, gering und eine ausgeprägte unspezifische Hintergrundfärbung verhinderte den Einsatz des Assays zur Quantifizierung subtiler Unterschiede in der Anzahl von Macula densa-Zellen. Eine entscheidende Steigerung der Anzahl angefärbter Macula densa-Zellen und eine Verbesserung des Signal-zu-Hintergrund-Verhältnisses konnte erst durch die Verwendung einer affinitätsgereinigten Form des Antikörpers mit einem modifizierten Protokoll erreicht werden. Eine COX-2-IR ließ sich auch für vereinzelte TAL Zellen ohne Assoziation zur Macula densa und für interstitielle Zellen der äußeren Medulla nachweisen (Tabelle 10).

anti COX-2-Antikörper	Spez	Zielpeptid	Ergebnis
Santa Cruz M19	gt	Carboxyterminal, Ratte	schwache Färbung von Sammelrohrzellen.
Santa Cruz N20	gt	Aminoterminal Ratte	Keine spezifische Immunfärbung
Santa Cruz H62	rb	AS 50-111, human	Keine spezifische Immunfärbung
Cayman	rb	AS 584-598, murine COX-2	Schwache Färbung einzelner Macula densa-Zellen, Steigerung der Anzahl im mit Bumetanid stimulierten Gewebe
Cayman	rb	AS 584-598, murine COX-2 Affinitäts-gereinigt	kräftige Färbung von Macula densa-Zellen, selten Färbung von vereinzelt Zellen des TAL und von interstitiellen Zellen der äußeren Medulla; schwache Färbung von Sammelrohrzellen

Tabelle 10: Auflistung der getesteten Antikörper gegen COX-2 mit den entsprechenden Zielpeptiden. Zugeordnet sind die jeweiligen Ergebnisse der Immunfärbung. (rb steht für rabbit, gt für goat)

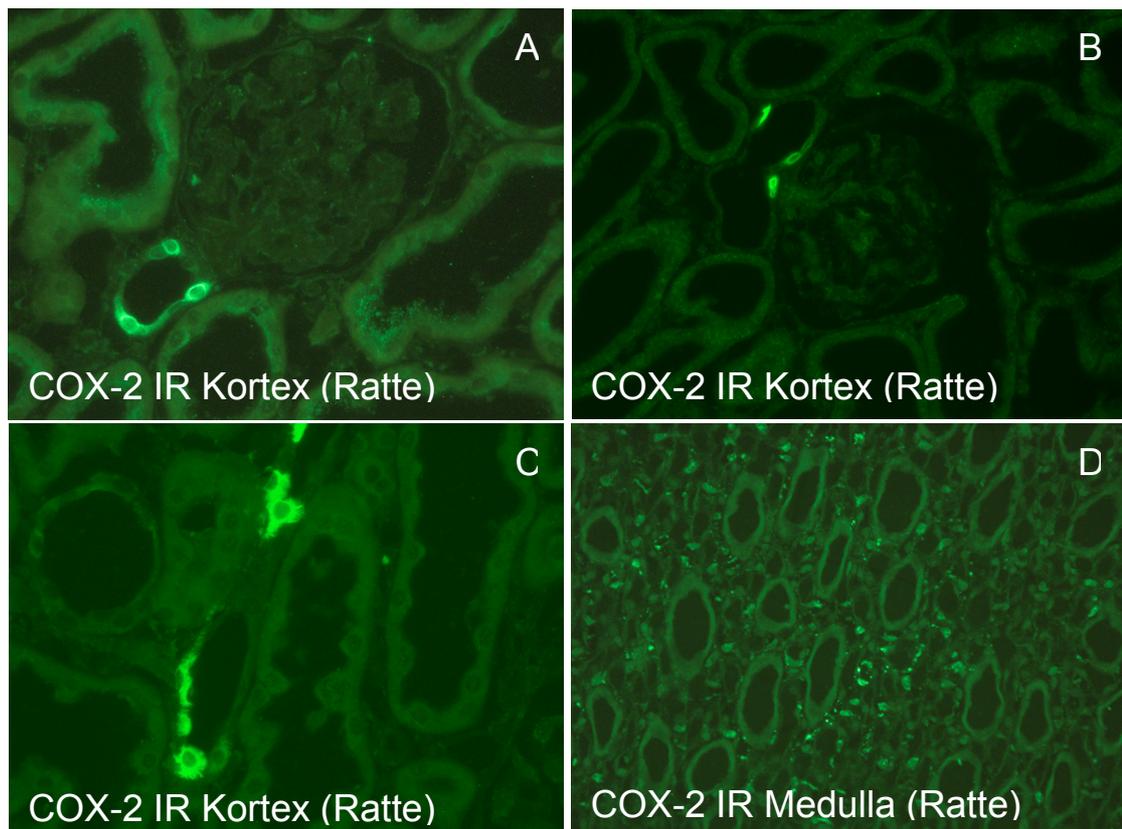


Abbildung 7: Lokalisation der COX-2 IR in der Ratte. Im renalen Kortex der Ratte (**A-C**) findet sich eine schwache, mit der Kernmembran assoziierte Immunfluoreszenz für COX-2 vor allem in direkt an die Makula densa angrenzenden oder der MD gegenüberliegenden Zellen des TAL (**A**). Seltener zeigt sich auch eine Immunfluoreszenz in den eigentlichen Macula densa Zellen (**B**). Ein kräftiges zytoplasmatisches Signal weisen einzelne Zellen des TAL ohne lokale Assoziation zur Macula densa auf (**C**). In der renalen Medulla (**D**) ist die Immunfluoreszenz für COX-2 auf interstitielle Fibroblasten beschränkt, wobei Anzahl der immunreaktiven Zellen und Intensität der Färbung in Richtung Papillenspitze zunehmen. Vergrößerung ca. x300 (**A-C**), (**D**) ca. x200.

Im Vergleich zur lokalen Verteilung der COX-2-Expression bei Ratten zeigte sich damit ein übereinstimmendes Bild, wobei deutliche Unterschiede in der in der quantitativen Verteilung der Expression auftraten. So zeigte sich bei den Mäusen eine ausgeprägte Immunfluoreszenz der eigentlichen Macula densa, während bei Ratten bevorzugt direkt an die Macula densa angrenzende Zellen des TAL COX-2 exprimierten. TAL Zellen ohne lokalen Bezug zur Macula densa waren dagegen in den Ratten häufiger angefärbt. Auch in der Medulla konnte eine signifikante Immunfluoreszenz nur in einzelnen Mäusen gezeigt werden.

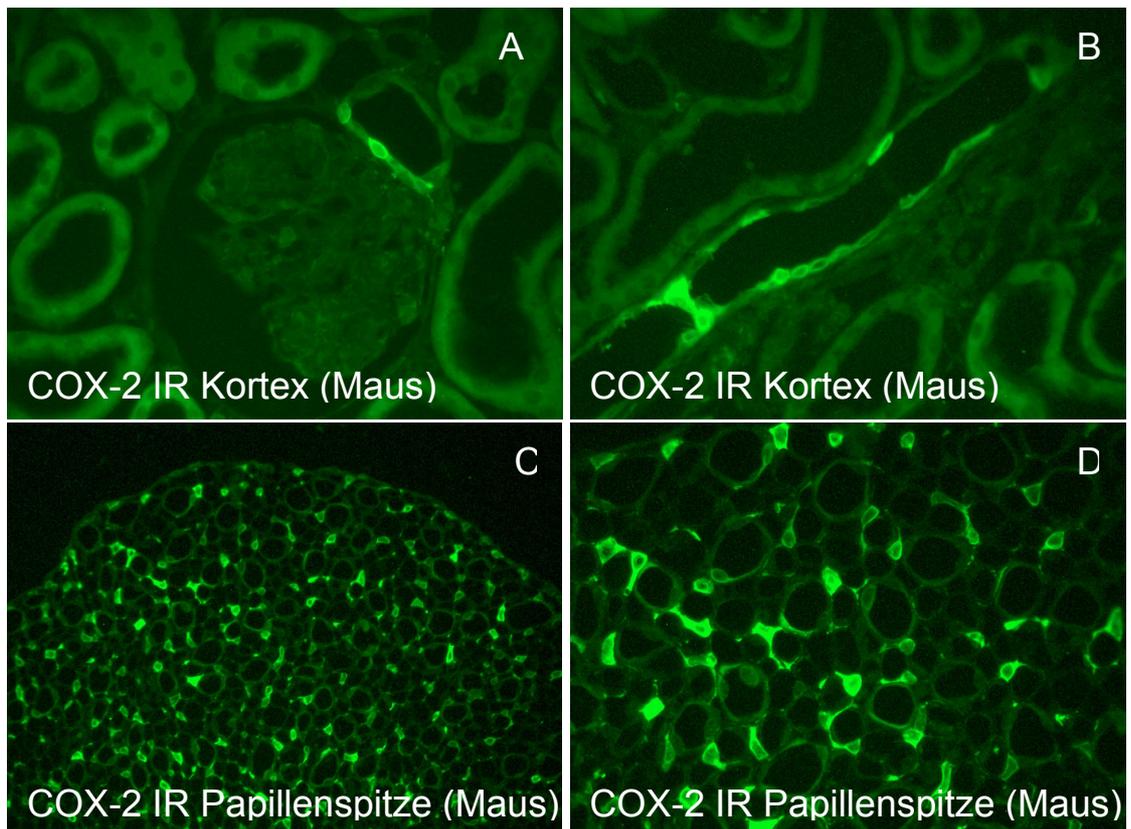


Abbildung 6: Lokalisation der COX-2 IR in der Maus. Im Gegensatz zum bei Ratten beobachteten Verteilungsmuster ist die kortikale Immunreaktivität für COX-2 in der Maus nahezu vollständig auf die Zellen der Macula densa beschränkt (A). Das Signal in der Macula densa ist dabei wie in der Ratte mit der Kernmembran assoziiert. Nur selten fand sich eine Färbung von TAL Zellen ohne lokale Assoziation zur Macula densa (B). Eine deutliche Immunreaktivität in der renalen Medulla fand sich nur in einzelnen Tieren. Dieses Signal war auf interstitielle Zellen beschränkt (C und D). Ein reproduzierbares epitheliales Signal in der Medulla fand sich nicht. (B-D) Vergrößerung ca. x300 (A,B,D), ca. x100 (C).

4.2 Effekt einer NKCC2-Blockade mit Bumetanid auf die Expression von COX-2 in der Maus

Zur weiteren Evaluierung des Immunoassays wurde der Effekt einer 3-tägigen Bumetanid-Behandlung auf die Macula densa-assoziierte Expression von COX-2 in der Maus untersucht. Dabei zeigte sich eine deutlich vermehrte Immunreaktivität (IR) bei den behandelten Tieren. Die Quantifizierung zeigte eine um 172% gesteigerte Anzahl COX-2 immunreaktiver Macula densa-Zellen in der mit Bumetanid behandelten Gruppe. Dieser Unterschied war hochsignifikant ($p=0,008$).

	Behandlung	
	Placebo	Bumetanid

Anzahl COX-2 immunoreaktiver Zellen (in positive Zellen/100 Glomeruli)	38±9,5 (n=6)	103±15,4 # (n=5)
---	-----------------	---------------------

Tabelle 11: Anzahl Cyclooxygenase-2 immunreaktiver Macula densa-Zellen pro 100 Glomeruli in Kontrollmäusen und mit Bumetanid behandelten Tieren. Der Vergleich zeigt eine signifikante Steigerung der Anzahl immunreaktiver Zellen in den mit Bumetanid behandelten Tieren. Die Werte sind als Mittelwert±Standardfehler angegeben. Mit n wird die Anzahl der untersuchten Tiere angegeben, # symbolisiert die statistische Signifikanz des gefundenen Unterschiedes.

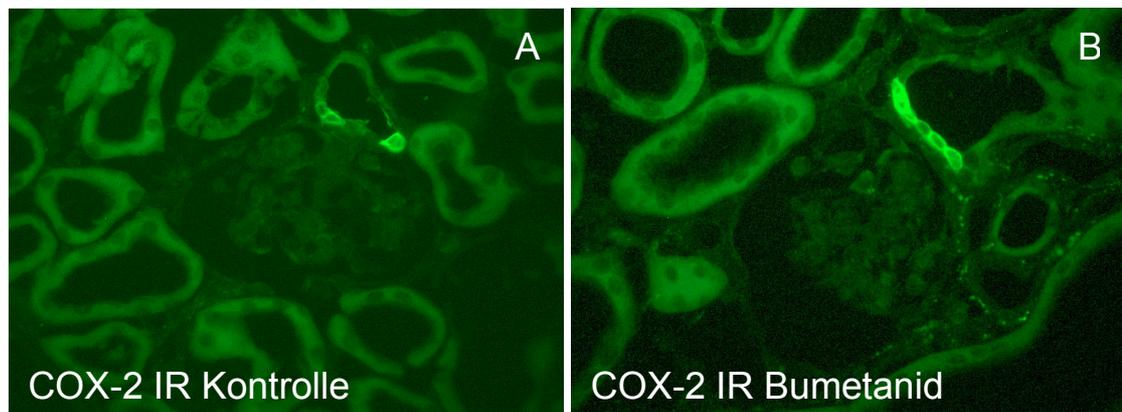


Abbildung 7: repräsentative Darstellung der COX-2 IR in Kontrollmäusen (**A**) und mit Bumetanid behandelten Tieren (**B**). Die Quantifizierung der Immunreaktivität zeigte eine signifikante Vermehrung immunreaktiver Zellen in den mit Bumetanid behandelten Tieren. Auch die Intensität der einzelnen Signale schien gesteigert. Vergrößerung ca. x300 (**A und B**).

4.3 Expression der JGA Parameter in NOS1^{-/-} Mäusen

4.3.1 Quantifizierung der renalen Renin-mRNA Expression, IR und der systemischen PRA in NOS1^{-/-} Mäusen

Zur Evaluation des Effektes von NOS1 auf die Expression und Freisetzung von Renin wurde die renale Renin-mRNA-Expression und IR sowie die Plasmaaktivität des Enzyms in NOS1-defizienten Mäusen bestimmt. Da die Salzabhängigkeit der Expression von Renin in der Maus bereits etabliert war [97], erfolgten diese Untersuchungen nur in den Gruppen mit normaler Salzaufnahme. Die vergleichende Untersuchung zwischen NOS1^{-/-} und Kontrolltieren zeigte keine signifikanten Unterschiede in der Größe der Fraktion Renin-immunoreaktiver JGA's. Im Gegensatz dazu war die Fraktion Renin-mRNA exprimierender JGA's in den NOS1-defizienten Mäusen im Vergleich zu den Kontrolltieren signifikant um 36% ($p=0,04$) und die PRA um 47% ($p=0,017$) reduziert.

	NOS1 ^{+/+}	NOS1 ^{-/-}
Renin-IR in pos. JGA/100 Glomeruli	45±4,6	42±3,8

(normale Salzaufnahme)	(n=4)	(n=5)
Renin mRNA ISH in pos. JGA/100 Glomeruli (normale Salzaufnahme)	35±8,2 (n=4)	22,4±7,8 [#] (n=5)
Renin-PRA in ng Ang I/μl*h (normale Salzaufnahme)	355±57 (n=4)	189±28 [#] (n=5)

Tabelle 12: Vergleich der renalen mRNA Expression und IR (in pos. JGA/100 Glomeruli) sowie PRA (in ng Angiotensin I/μl Serum und Stunde) in NOS1 defizienten Mäusen (NOS1^{-/-}) und Kontrolltieren (NOS1^{+/+}) mit normaler Salzaufnahme. Während die IR für Renin keinen signifikanten Unterschied aufweist, sind sowohl mRNA Expression als auch Plasmaaktivität supprimiert. Alle Werte sind als Mittelwerte ±Standardfehler angegeben. Mit n wird die Anzahl der untersuchten Tiere angegeben, # symbolisiert die statistische Signifikanz des gefundenen Unterschiedes.

4.3.2 Macula densa-assoziierte COX-2-Immunreaktivität in NOS1^{-/-} Mäusen

Ziel dieser Teilstudie war die Charakterisierung des Einflusses von NOS1 auf die Menge von COX-2 Protein in der Macula densa. Zu diesem Zweck wurden NOS1-defiziente Mäuse und die entsprechenden Kontrolltiere mit Diäten mit unterschiedlichem Salzgehalt gefüttert und die Anzahl COX-2-immunreaktiver Macula densa-Zellen pro 100 Glomeruli bestimmt. Dabei zeigte sich, dass die unterschiedliche Salzaufnahme zu reziproken Veränderungen der Anzahl COX-2-immunreaktiver Zellen führt. In den Kontrollgruppen zeigten die Tiere mit hoher Salzaufnahme eine Reduktion der Anzahl COX-2-immunreaktiver Zellen um 23% ($p < 0,001$) und die Tiere mit der niedrigen Salzaufnahme eine Steigerung dieser Anzahl um 42% ($p = 0,05$). In den Tieren mit normaler Salzaufnahme lag die Anzahl COX-2-immunreaktiver Zellen in den NOS1-defizienten Mäusen auf dem Niveau der Kontrollgruppe. Statistische Unterschiede bestanden nicht. Sowohl in den mit der salzreichen als auch in den mit der salzarmen Diät gefütterten Tieren war die Anzahl der COX-2-immunreaktiven Zellen in den NOS1-defizienten Tieren numerisch größer als die der entsprechenden Kontrollmäuse (111% und 40%). Diese Unterschiede waren jedoch nicht signifikant.

	NOS1+/+	NOS1-/-
COX-2-Expression in Zellen/100 Glomeruli (normale Salzaufnahme)	43±8,2 (n=4)	41±14,4 (n=5)
COX-2-Expression in Zellen/100 Glomeruli (salzarme Diät)	61,2±3,1 [#] (n=4)	86,1±7 [#] (n=6)
COX-2-Expression in Zellen/100 Glomeruli (salzreiche Diät)	9,6±1,1 [#] (n=5)	20,3±2,2 [#] (n=6)

Tabelle 13: Vergleich der renalen IR für COX-2 (in pos. Zellen/100 Glomeruli) in NOS1-defizienten Mäusen (NOS1-/-) und Kontrolltieren (NOS1+/+) mit normaler, niedriger und hoher Salzaufnahme. Die unterschiedliche Salzaufnahme führt sowohl in den NOS1-defizienten Mäusen als auch in den Kontrolltieren zu signifikanten reziproken Veränderungen der Anzahl COX-2-immunreaktiver Macula densa-Zellen (symbolisiert durch #). Signifikante, vom Genotyp abhängigen Unterschiede gab es nicht. Alle Werte sind als Mittelwerte ±Standardfehler angegeben. Mit n wird die Anzahl der untersuchten Tiere angegeben.

4.4 Untersuchung der der renalen Morphologie und der JGA Parameter in COX-2-defizienten Mäusen

4.4.1 Renale Morphologie und glomeruläre Morphometrie in COX-2-/- Mäusen

Der renale Kortex erwachsener COX-2-/- Mäuse weist im Vergleich zu den Wildtyp-Mäusen erhebliche strukturelle Veränderungen auf [98]. Diese beeinflussen vermutlich die Expression von NOS1 im JGA. Zur Erleichterung der Interpretation der Resultate der Untersuchung der NOS1-Aktivität erfolgte daher zunächst eine Quantifizierung dieser morphologischen Veränderungen.

In den 3 Monate alten COX-2-defizienten Mäusen war der Durchmesser der Nieren entlang der kortiko-papillären Achse um 34% niedriger als der Durchmesser der Nieren der Kontrolltiere ($p=0,02$). Die durchschnittliche Anzahl von Glomeruli auf einem standardisierten kortikalen Schnitt war um 51% niedriger als in den Kontrolltieren ($p<0,001$). In den Nieren der COX-2-defizienten Mäuse war die durchschnittliche Größe der Glomeruli in der oberflächlichen Hälfte des renalen Kortex um 18% niedriger ($p=0,001$) und die Größe der juxtamedullären Glomeruli um 70% größer ($p=0,006$) als in den Kontrolltieren. Die Morphologie der hypertrophierten Glomeruli im juxtamedullären Kortex der COX-2-defizienten Mäuse war normal. Die undifferenzierten Glomeruli des subkapsulären Raumes zeigten variable Anzeichen einer fokal segmentalen Glomerulosklerose mit mesangialer Matrixvermehrung und Anheftungen des glomerulären Tuft's an das parietale Blatt der Bowman'schen Kapsel.

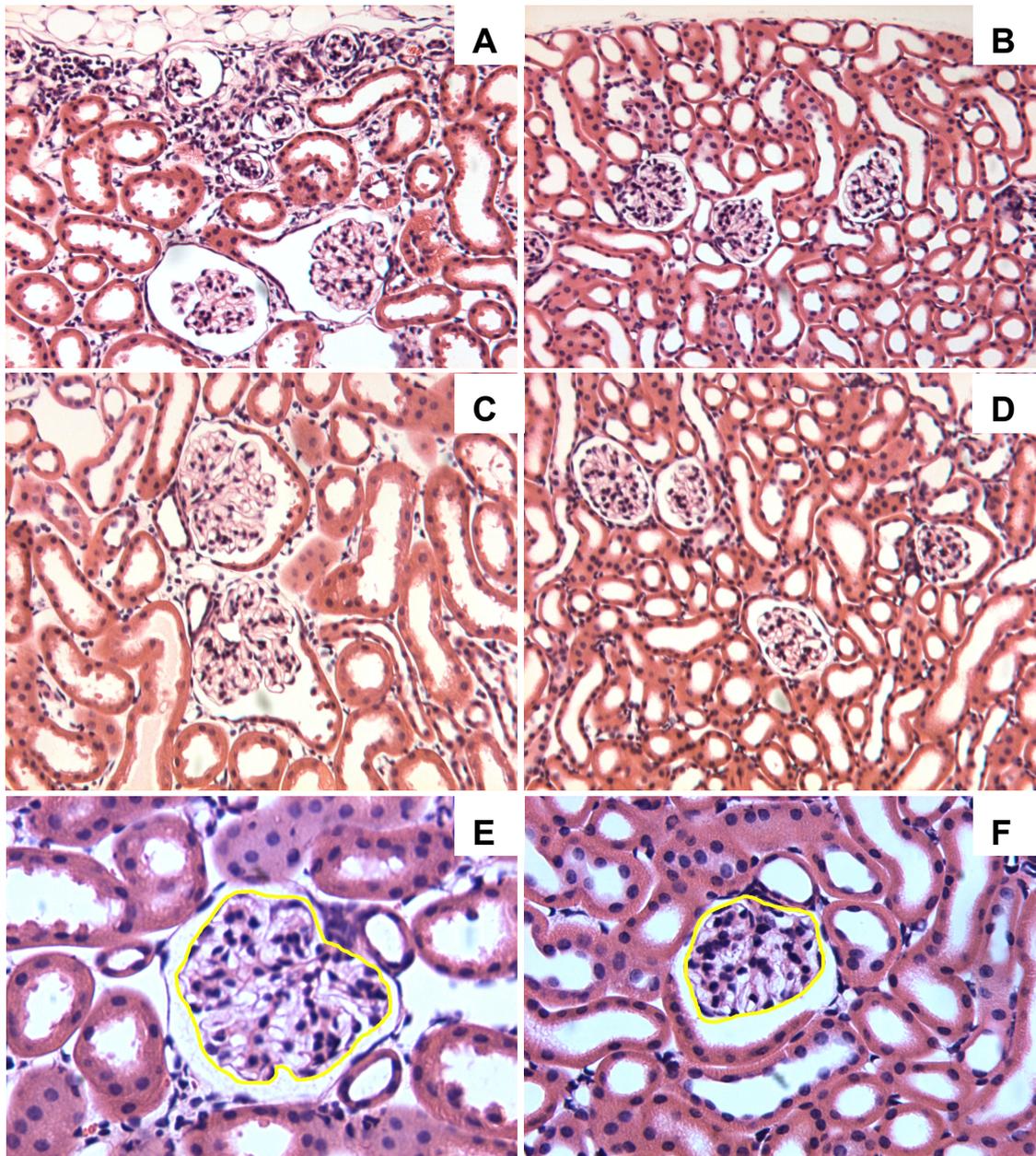


Abbildung 8: Repräsentative Darstellung der renalen Morphologie von COX-2 defizienten Mäusen (**A,C,E**) im Vergleich zu Kontrolltieren (**B,D,F**). Im Alter von 3 Monaten zeigten die COX-2^{-/-} Mäuse Anzeichen für eine Unterentwicklung der subkapsulären Region des Kortex mit einer Persistenz von undifferenzierten Mesenchym und unreifen kleinen Glomeruli (**A**). Im Gegensatz dazu erschienen die Nephrone der juxtamedullären Hälfte des Kortex der COX-2^{-/-} deutlich hypertrophiert (**C und E**). Im Vergleich dazu zeigen die Kontrolltiere in beiden untersuchten Regionen (**B** oberflächliche und **F** juxtamedulläre Hälfte) eine normale Morphologie und vergleichbare Grössenverhältnisse der Nephrone (**B,D,F**). Die gelbe Linie in (**E**) und (**F**) markiert die Grenzen des glomerulären Tufts anhand derer die Größe des Glomerulums bestimmt wurde. HE Färbung an an 4µm dicken Paraffinschnitten; Vergrößerung ca. x150 (**A-D**), ca. x300 (**E-F**).

	COX-2+/+ n=4	COX-2-/- n=4
Anzahl der Glomeruli je Schnitt entlang der kortikopapillären Achse in Glomeruli	193±8,8	93,8±3,8 [#]
Durchschnittliche Stärke des renalen Kortex in (µm)	995±55,8	659±26,7 [#]
Durchschnittliche Fläche der Glomeruli in der oberflächlichen Hälfte des renalen Kortex in (µm ²)	3290±74	2680±89 [#]
Durchschnittliche Fläche der Glomeruli in der tiefen Hälfte des renalen Kortex in (µm ²)	4542±266	7705±653 [#]

Tabelle 14: Quantifizierung morphologischer Veränderungen im Kortex von COX-2 defizienten Mäusen (COX-2-/-) im Vergleich zu Kontrolltieren (COX-2+/+) gleichen Alters. Der renale Kortex der COX-2-/- Mäuse ist insgesamt kleiner als der der Kontrolltiere und enthält weniger Glomeruli. Die Größe einzelner Glomeruli (angegeben als Schnittfläche des glomerulären Tufts, normalisiert auf die Anzahl beurteilter Glomeruli) war unterschiedlich in Abhängigkeit von der Lokalisation innerhalb des Kortex. Während die Glomeruli in der subkapsulären Hälfte des Kortex der COX-2-/- Mäuse signifikant kleiner waren als die der Kontrolltiere, waren die Größenverhältnisse im juxtamedullären Anteil umgekehrt. Alle Werte sind als Mittelwerte ±Standardfehler angegeben. Mit n wird die Anzahl der untersuchten Tiere angegeben, # symbolisiert die statistische Signifikanz des gefundenen Unterschiedes.

4.4.2 NOS1-Expression in COX-2-/- Mäusen

Zur Evaluation des Effektes von COX-2-Produkten auf die Expression von NOS1 im JGA wurden junge erwachsene COX-2-/- Mäuse mittels NOS1-Immunfluoreszenz und Diaphorase-Reaktion untersucht. Aufgrund der beobachteten morphologischen Unterschiede zwischen subkapsulärem und juxtamedullärem Anteil des Kortex wurde dabei auf die räumliche Verteilung der NOS1-positiven JGA geachtet.

Eine IR für NOS1 ließ sich nur in den JGA's der differenzierten Glomeruli nachweisen. Die Quantifizierung ergab, dass die Zahl immunreaktiver Macula densa-Zellen in der subkapsulären Hälfte des Kortex in den COX-2-defizienten Tieren um 63,5% über der Anzahl in den Kontrolltieren lag (p=0,002). In der juxtamedullären Hälfte des Kortex der COX-2-defizienten Mäuse lag die Anzahl um 168% über der der Kontrollmäuse (p=0,002). Die Auswertung der Diaphoraseaktivität der entsprechenden Gewebe ergab vergleichbare Resultate.

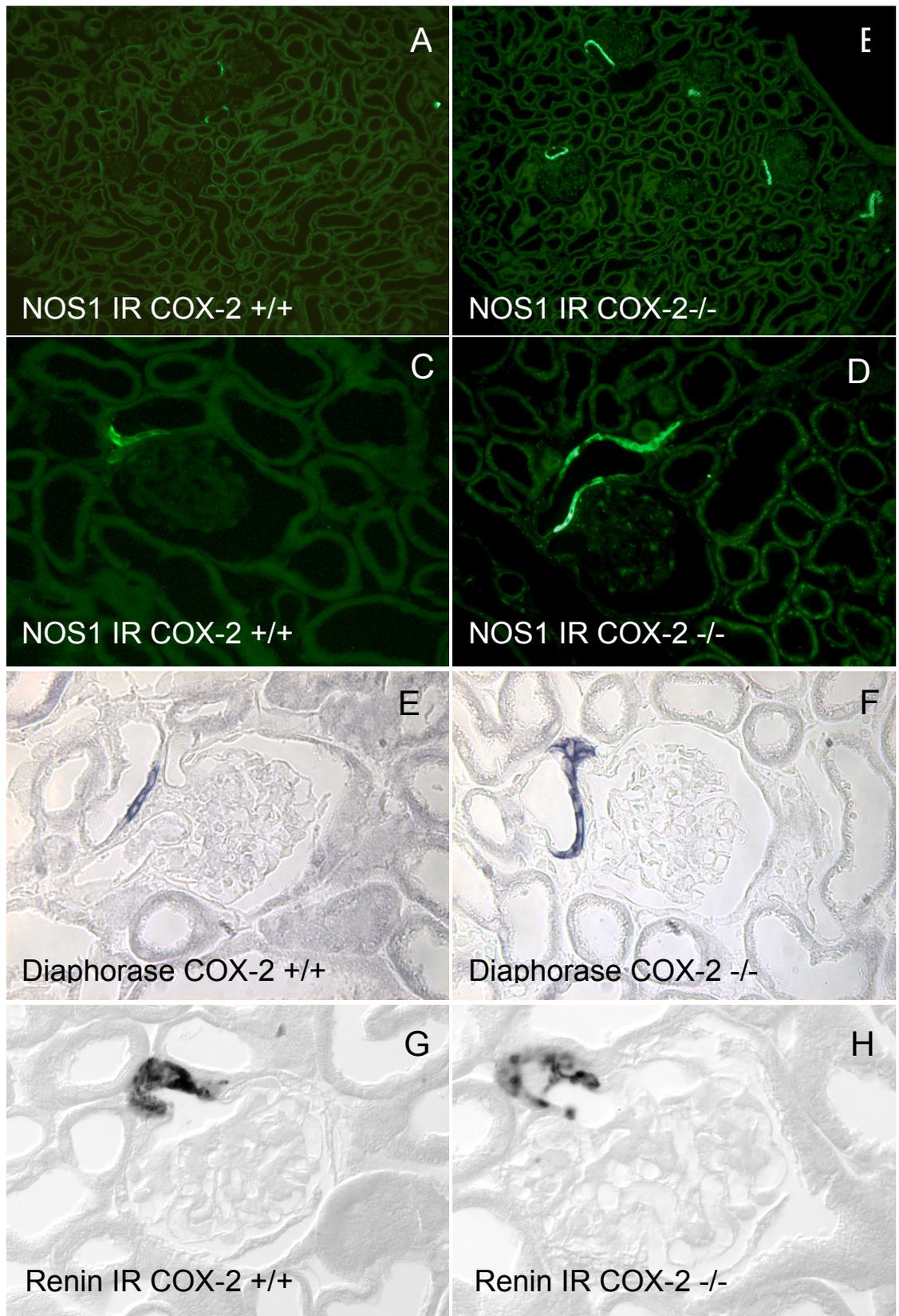


Abbildung 9: Repräsentative Darstellung der NOS1 IR (A-D), Diaphorasereaktivität (E-F) und Renin IR (G,H) in COX-2^{-/-} (B,D,F,H) und Kontrollmäusen (A,C,E,G). Die Übersichtsaufnahmen (A-B) zeigen die deutlich gesteigerte NOS1 IR im Kortex der COX-2^{-/-} im Vergleich zu den

Kontrolltieren. Die stärkere Vergößerung zeigt, dass in den COX-2^{-/-} eine Rekrutierung nicht zur MD gehöriger Zellen stattgefunden hat (**D**). Die Kontrollmäuse zeigen ein normales Expressionsmuster (**C**). Die Diaphorasereaktion bestätigt die Resultate der Immunfluoreszenz. Die Renin-Immunhistochemie zeigte bei den COX-2^{-/-} (**H**) eine im Vergleich zu den Kontrolltieren (**G**) reduzierte mittlere Signalintensität. Auch die Anzahl immunreaktiver JGA war reduziert. NOS1 Immunfluoreszenz, Diaphorasereaktion und Renin-Immunhistochemie an 6 µm dicken Kryostatschnitten, Vergößerung ca. x100 (**A-B**); ca. x300 (**C-H**).

4.4.3 Renin-Expression in COX-2^{-/-} Mäusen

COX-2-defiziente Mäuse haben eine verminderte Plasmaaktivität und eine verminderte renale Expression von Renin [97]. Der Einfluss der morphologischen Veränderungen des renalen Kortex auf die Expression des Enzyms war jedoch nicht bekannt. In diesem Teil der Studie sollte daher das Verteilungsmuster der Renin-produzierenden JGA´s mittels Renin-Immunhistochemie aufgeklärt werden. Die Fraktion der immunreaktiven JGA in den Nieren der COX-2-defizienten Mäuse lag 38% unter der Anzahl in den Kontrolltieren (p=0,03). Die Synthese von Renin war dabei auf die JGA der terminal differenzierten Glomeruli beschränkt.

	COX+/+ (n=4)	COX-2 ^{-/-} (n=4)
Anzahl NOS1-immunreaktiver Macula densa-Zellen in der oberflächlichen Hälfte des renalen Kortex in (Zellen/100 Glomeruli)	126±3,4	206±15,4 [#]
Anzahl NOS1-immunreaktiver Macula densa-Zellen in der juxtamedullären Hälfte des renalen Kortex in (Zellen/100 Glomeruli)	188±28	503±54 [#]
Anzahl der diaphoraseaktiven Macula densa-Zellen in der oberflächlichen Hälfte des renalen Kortex in (Zellen/100 Glomeruli)	67±6	80±8 [#]
Anzahl der diaphoraseaktiven Macula densa-Zellen in der juxtamedullären Hälfte des renalen Kortex in (Zellen/100 Glomeruli)	66±23	222±29 [#]
Anzahl Renin-immunreaktive JGA in (JGA/100 Glomeruli)	51±2,3	32±6,4 [#]

Tabelle 15: Quantifizierung der NOS1-IR und Enzymaktivität sowie der Renin-IR in Kontrolltieren und COX-2-defizienten Mäusen. Der Vergleich zeigt eine konstant erhöhte Anzahl NOS1-immunreaktiver Macula densa-Zellen im Kortex der COX-2-defizienten Mäuse. Diese Steigerung war in den juxtamedullär gelegenen Glomeruli besonders ausgeprägt. Die Diaphorasereaktion zeigte vergleichbare Ergebnisse. Die Fraktion Renin immunreaktiver JGA in den COX-2-defizienten Tieren war dagegen signifikant kleiner als die der Kontrollmäuse. Alle Werte sind als Mittelwerte \pm Standardfehler angegeben. Mit n wird die Anzahl der untersuchten Tiere angegeben, # symbolisiert die statistische Signifikanz der gefundenen Unterschiede.

4.4.4 Renale Morphologie älterer COX-2-/- Mäuse

Im folgenden Teil der Studie sollten die Langzeit-Effekte der strukturellen und funktionellen Veränderungen im renalen Kortex der COX-2-/- untersucht werden. Zu diesem Zweck wurden 12 Monate alte COX-2-/- mit Kontrolltieren gleichen Alters und mit jungen COX-2-/- Mäusen verglichen.

Diese Untersuchungen zeigten massive Infiltrationen inflammatorischer Zellen in den perivaskulären und tubulointerstitiellen Raum der alten COX-2-/. Im subkapsulären Kortex-Anteil fanden sich weiterhin kleine Glomeruli mit einem unreifen Phänotyp. Das bei jungen COX-2-/- regelmäßig vorhandene nephrogene Parenchym ließ sich jedoch nicht mehr nachweisen. Eine Reihe von Glomeruli in den tiefer gelegenen Kortex-Anteilen der 12 Monate alten COX-2-/- zeigten Veränderungen im Sinne einer fokal segmentalen Glomerulosklerose. Die Schäden reichten hier von einer Vermehrung der mesangialen Matrix und Anheftungen des glomerulären Tuft's an das parietale Blatt der Bowman'schen Kapsel bis hin zur Bildung typischer sklerotischer Halbmonde und einer globalen Sklerosierung. Die Quantifizierung der glomerulären Schäden zeigte eine signifikante Erhöhung der Zahl betroffener Glomeruli und der Schwere der Schäden im Vergleich zu Kontrolltieren gleichen Alters und jungen COX-2-defizienten Mäusen. Der Glomerulosklerose-Index der jungen COX-2-defizienten Mäuse lag um 581% ($p=0,03$) über den Werten der Kontrolltiere gleichen Alters. Der Vergleich der 12 Monate alten Tiere zeigte sogar eine Steigerung um 810% in den COX-2-defizienten Tieren ($p=0,01$).

	COX-2+/+	COX-2+/+	COX-2-/-	COX-2-/-
	3 Monate	12 Monate	3 Monate	12 Monate
Glomeruloskleroseindex in Punkte/100 Glomeruli	2,2 \pm 0,6 (n=4)	7,7 \pm 1,2 (n=3)	15 \pm 4 [#] (n=5)	70 \pm 7,2 ^{#*} (n=4)

Tabelle 16: Quantifizierung morphologischer Schäden in 3 und 12 Monate alten Tieren. Der Vergleich zeigt eine signifikant vermehrte glomeruläre Schädigung in den Nieren alter und junger COX-2-defizienter Mäuse im Vergleich zu den Kontrolltieren (symbolisiert durch #). Das Ausmaß der glomerulären Schäden in den alten COX-2^{-/-} Mäusen war dabei signifikant größer als das der jungen Tiere (symbolisiert durch *). Die Kontrollmäuse beider Altersstufen zeigten eine normale renale Morphologie. Alle Werte sind als Mittelwerte \pm Standardfehler angegeben. Mit n wird die Anzahl der untersuchten Tiere angegeben.

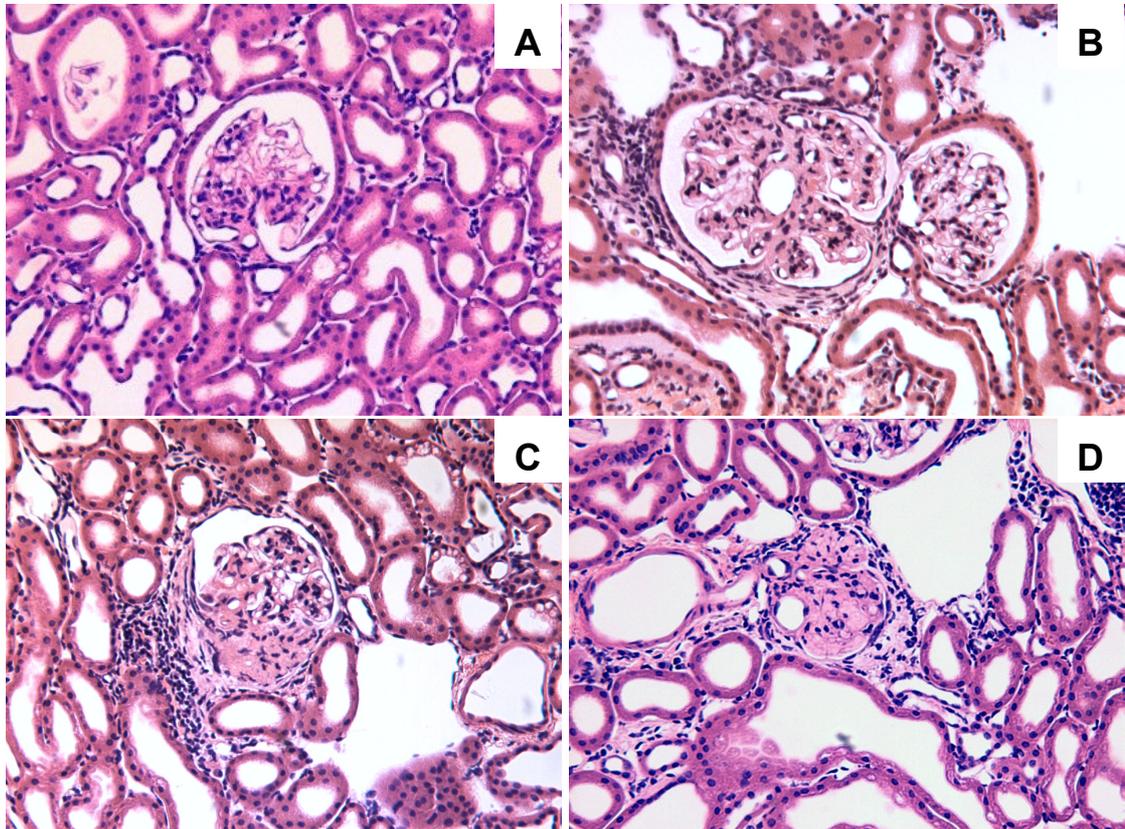


Abbildung 9: Exemplarische Darstellung von Glomeruli aus den Nieren von 12 Monate alten COX-2^{-/-} Mäusen. Das mit **(A)** bezeichnete Glomerulum zeigt Anzeichen für eine Vermehrung der mesangialen Matrix durch Infiltration inflammatorischer Zellen. Die Veränderungen betreffen nur einen Teil der Kapillarschlingen während der Rest eine normale Morphologie aufweist. In **(B)** erkennt man die Profile von 2 Glomeruli wobei das kleinere Glomerulum eine normale Morphologie aufweist. Das größere Glomerulum zeigt ebenfalls Zeichen einer mesangialen Matrixexpansion und zusätzlich 2 *tip lesions* in denen es zu einer Anheftung der Kapillarschlingen an das parietale Blatt der Bowman'schen Kapsel gekommen ist. Der periglomeruläre Raum ist erweitert und zeigt eine Akkumulation von inflammatorischen Zellen. Das in **(C)** dargestellte Glomerulum zeigt das typische Bild einer sklerotischen Halbmondbildung mit einer geringeren Schädigung der restlichen Kapillarschlingen. Das in **(D)** dargestellt Glomerulum ist vollständig sklerotisiert. Hier zeigen sich auch Anzeichen für eine interstitielle Inflammationsreaktion und eine zystische Degeneration einzelner Tubulusabschnitte. HE-Färbung an 4 μ m dicken Paraffinschnitten; Vergrößerung ca. x300 **(A-C)**, ca. x200 **(D)**.

4.5 Effekt von Apocynin auf oxidativen Stress, Blutdruck, Nierenfunktion und JGA-Parameter in SHR und WKY

Ziel dieser Studie war die Untersuchung der Wirkung des NADPH-Oxidase-Inhibitors Apocynin auf die Expression der vasoaktiven Enzymsysteme am JGA

von SHR und WKY. Zum Nachweis der Wirksamkeit der Behandlung wurde zunächst die Ausscheidung von 8-Isoprostan F2 α im Urin bestimmt. Der Effekt von Apocynin auf den arteriellen Blutdruck und die Nierenfunktion wurde mittels Schwanzplethysmographie bzw. Bestimmung der Creatinin-Clearance gemessen. Der Einfluss von Apocynin auf die JGA Parameter wurde durch Immunfluoreszenz (für COX-2 und NOS1) sowie durch Immunhistochemie und mRNA ISH (Renin) gemessen. Die Aktivität des systemischen RAAS wurde durch Messung der PRA bestimmt.

4.5.1 Effekt von Apocynin auf den Blutdruck in SHR und WKY

Am Ende der 3-wöchigen Behandlungszeit zeigten die SHR Blutdruckwerte, welche um 33% über denen der WKY lagen ($p < 0,001$). Die Behandlung mit Apocynin führte in den SHR zu einer numerischen Reduktion des Blutdruckes um 8% ($p = 0,14$) und hatte bei den WKY Ratten keinen Effekt.

4.5.2 Effekt von Apocynin auf die Urin-Ausscheidung von 8-Isoprostan F2 α von SHR und WKY

Die Ausscheidung von 8-Isoprostan F2 α im 24 Stunden Sammelurin der SHR lag um 31% über der der WKY Kontrollgruppe ($p = 0,03$). In den Apocynin behandelten SHR war die Exkretion gegenüber den unbehandelten SHR signifikant um 42% vermindert ($p = 0,04$) und nicht unterscheidbar von der WKY Kontrollgruppe. Bei den WKY hatte die Behandlung mit Apocynin keinen Effekt.

4.5.3 Effekt von Apocynin auf die Creatinin Clearance in SHR

Die Creatinin Clearance wurde aus technischen Gründen nur für die SHR bestimmt. Dabei zeigte sich, dass die Clearance in den mit Apocynin behandelten Tieren keine signifikanten Unterschiede zu der der Kontrolltiere aufwies.

	WKY Kon (n=5)	WKY Apo (n=5)	SHR Kon (n=5)	SHR Apo (n=5)
Blutdruck (mmHg)	132 \pm 6,1	131 \pm 4,41	176 \pm 6,9 [#]	163 \pm 3,6
24h 8F α -Isoprostan Aus- scheidung im Urin (ng/24h)	14,8 \pm 3,3	12,1 \pm 1,34	32,4 \pm 3,8 [#]	18,7 \pm 2,1 [*]
Creatinin Clearance (ml/min)			1,23 \pm 0.15	0,99 \pm 0.13

Tabelle 17: Gegenüberstellung der Messwerte für Blutdruck und 24 Stunden-Ausscheidung von 8 Isoprostan F2 α im Urin von WKY und SHR sowie Creatinin Clearance in SHR. Die mit Apocynin behandelten Gruppen wurden mit „Apo“, die Kontrolltiere mit „Kon“ gekennzeichnet. Am Ende der Studie zeigten die SHR eine deutlich hypertensive Blutdruckregulation. Diese wurde durch die Apocyninbehandlung nicht signifikant beeinflusst. Die Ausscheidung von 8 Isoprostan im Urin lag in den unbehandelten SHR signifikant über den in WkY gemessenen Werten. Die Behandlung mit Apocynin führte zu einer signifikanten Reduktion der Ausscheidung. Die Creatinin Clearance in den SHR wurde durch die Behandlung mit Apocynin nicht verändert. Alle Werte sind als Mittelwerte \pm Standardfehler angegeben. Mit n wird die Anzahl der untersuchten Tiere angegeben, # symbolisiert statistisch signifikante Unterschiede zu WKY Kontrolltieren. * symbolisiert die statistische Signifikanz des Unterschiedes zwischen behandelten und nicht behandelten SHR.

4.5.4 Effekt von Apocynin auf die NOS1-IR in SHR und WKY

Die Zahl NOS1-immunreaktiver Macula densa-Zellen in den SHR lag um 50% über der Anzahl in den WKY Kontrolltieren ($p=0,006$). In den mit Apocynin behandelten SHR reduzierte sich die Zahl der NOS1-exprimierenden Zellen um 30% ($p=0,007$) während die Behandlung keinen Einfluss auf die Zahl der NOS1-immunreaktiven Zellen in den WKY hatte.

4.5.5 Effekt von Apocynin auf die COX-2-Expression in SHR und WKY

In den unbehandelten SHR lag die Zahl COX-2-immunreaktiver Zellen in der Macula densa oder in deren unmittelbarer Nähe um 64% unter der der unbehandelten WKY ($p=0,033$). Die Apocyninbehandlung hatte weder in den SHR noch in den WKY einen Effekt auf die Expression von COX-2.

	WKY Kon	WKY Apo	SHR Kon	SHR Apo
NOS1-IR in pos. Zellen/100 Glomeruli	119 \pm 11 (n=5)	105 \pm 15,7 (n=5)	179 \pm 11 [#] (n=4)	125 \pm 9* (n=5)
COX-2-IR in pos. Zellen/100 Glomeruli	66 \pm 7,2 (n=5)	69 \pm 8 (n=5)	23,5 \pm 3,2 [#] (n=5)	18,8 \pm 3,8 (n=5)

Tabelle 18: Quantifizierung der JGA assoziierten IR für COX-2 und NOS1 in WKY Ratten und SHR mit (Apo) oder ohne (Kon) Apocyninbehandlung. Der Vergleich zeigt eine im Vergleich zu den WKY signifikant gesteigerte NOS1-IR in den JGA der unbehandelten SHR. Die Behandlung mit Apocynin führte in den SHR zu einer Normalisierung der NOS1-IR auf das Niveau der WKY. Im Vergleich zu den WKY Kontrolltieren zeigten die SHR eine supprimierte COX-2-IR. Die Behandlung mit Apocynin führte nicht zu signifikanten Veränderungen. Alle Werte sind als Mittelwerte \pm Standardfehler angegeben. Mit n wird die Anzahl der untersuchten Tiere angegeben, # symbolisiert statistisch signifikante Unterschiede zu WKY Kontrolltieren. * symbolisiert die statistische Signifikanz des Unterschiedes zwischen behandelten und nicht behandelten SHR.

4.5.6 Effekt von Apocynin auf Synthese und Ausschüttung von Renin in SHR und WKY

Die Anzahl Renin-immunreaktiver JGA war in den unbehandelten SHR um 49% niedriger als die der WKY ($p=0.04$). Die Behandlung mit Apocynin führte zu einer weiteren Reduktion um 38% ($p=0,01$). In den WKY hatte die Behandlung mit Apocynin keinen Effekt auf die Anzahl Renin-immunreaktiver JGA.

Die Fraktion Renin-mRNA positiver JGA in den behandelten SHR war um 57% niedriger als in den unbehandelten Tieren ($p=0,005$). Die PRA war um 93% niedriger als die der WKY ($p<0.001$). Die Behandlung führte weder in SHR noch in WKY zu signifikanten Änderungen der Renin-mRNA Expression bzw. der Plasmaaktivität des Enzyms.

	WKY Kon	WKY Apo	SHR Kon	SHR Apo
Renin-IR in (pos. JGA/100 Glomeruli)	31,6±2,4 (n=5)	30±0,9 (n=5)	16,4±0,7 (n=4)	10±0,6 (n=5)
Renin-mRNA Expression in (pos. JGA/100 Glomeruli)	23±4 (n=5)	26±1.6 (n=5)	10±3 (n=5)	7.2±1.2 (n=5)
Renin-PRA in (ng Ang I/ml*h)	6,0±0,75 (n=5)	9,7±2,31 (n=5)	0,43±0,17 (n=5)	0,23±0,1 (n=5)

Tabelle 19: Quantifizierung der JGA assoziierten Renin-IR und mRNA-Expression sowie der PRA in WKY und SHR mit (Apo) oder ohne (Kon) Apocyninbehandlung. Der Vergleich zeigt eine im Vergleich zu den WKY Kontrolltieren signifikante Verminderung der gemessenen Parameter in den SHR. Die Apocyninbehandlung führte in den SHR zu einer signifikanten Reduktion der Renin IR. Renin-mRNA-Expression und PRA blieben jedoch unverändert. Alle Werte sind als Mittelwerte±Standardfehler angegeben. Mit n wird die Anzahl der untersuchten Tiere angegeben, # symbolisiert statistisch signifikante Unterschiede zu WKY Kontrolltieren. * symbolisiert die statistische Signifikanz des Unterschiedes zwischen behandelten und nicht behandelten SHR.

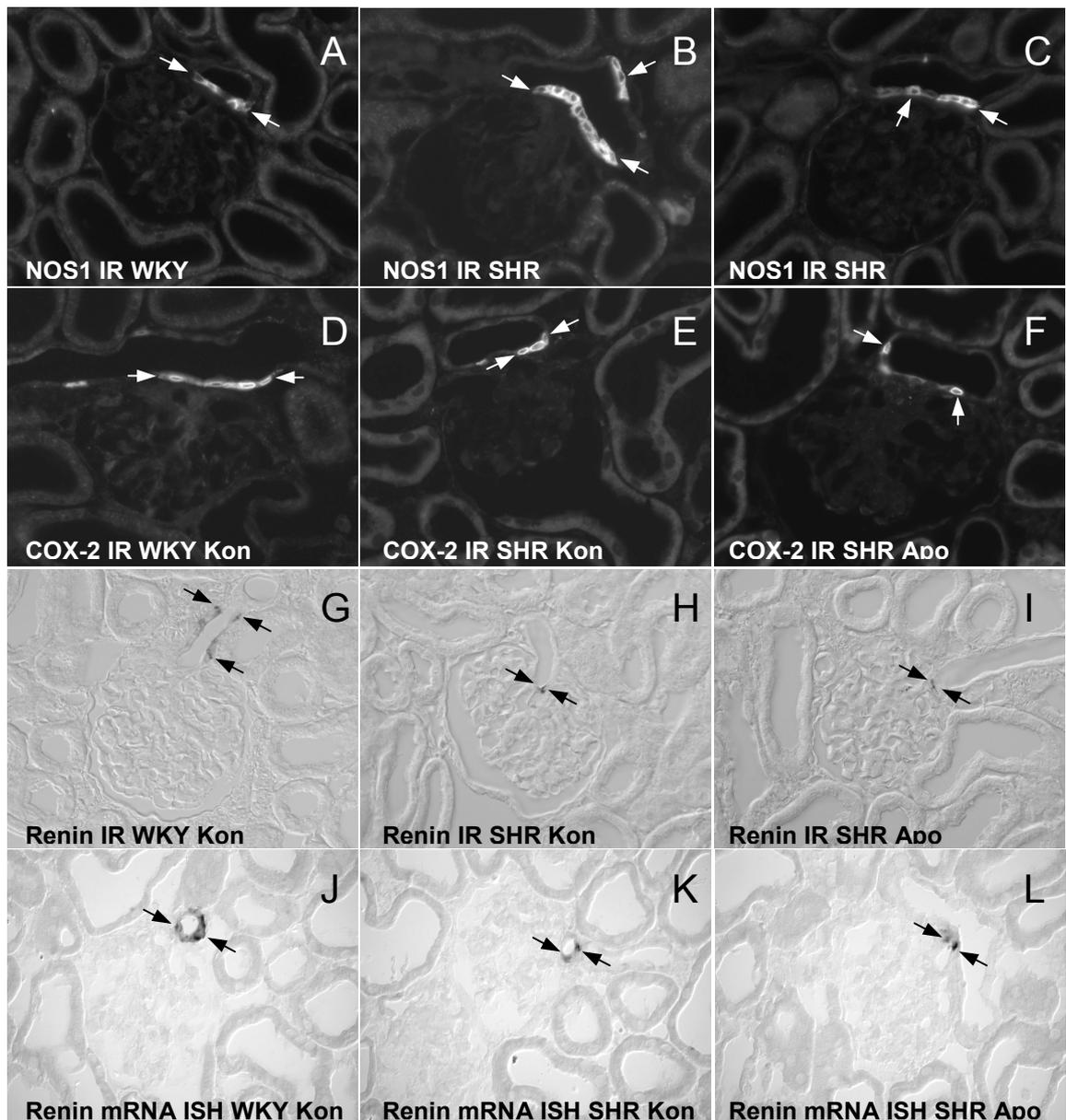


Abbildung 10: Repräsentative Darstellung der JGA Parameter: in der linken Spalte (**A,D,G,J**) unbehandelte WKY, in der Mitte unbehandelte SHR (**B,E,H,K**) und Apocynin behandelte SHR in der rechten Spalte (**C,F,I,L**). Da bei keinem der untersuchten Parameter behandlungsbedingte Unterschiede zwischen den WKY Gruppen auftraten wurde auf eine Dokumentation der mit Apocynin behandelten WKY verzichtet. Zur besseren Veranschaulichung wurden die für NOS1 und COX-2 immunreaktiven Zellen sowie die Renin-mRNA bzw. Protein positiven JGA mit Pfeilen markiert.

A,B,C: Die NOS1 Immunfluoreszenz in den WKY (**A**) zeigt eine kräftige Färbung von Macula densa Zellen. Im Vergleich mit den WKY zeigten die unbehandelten SHR (**B**) eine signifikant höhere Anzahl NOS1 immunreaktiver Macula densa Zellen pro beobachtetem Glomerulum und auch der Anteil positiver JGA war deutlich größer. In einzelnen Fällen ließ sich sogar eine NOS1 Immunfluoreszenz in den an die Macula densa angrenzenden Zellen des TAL nachweisen. Die Behandlung der SHR mit Apocynin (**C**) führte zu einer deutlichen und signifikanten Reduktion der Anzahl NOS1 immunreaktiver Macula densa Zellen.

D,E,F Die COX-2 Immunfluoreszenz in den WKY Ratten (**D**) zeigt ein kräftiges Immunfluoreszenzsignal in der Macula densa selbst und in einzelnen, an die Macula densa anschließenden TAL Zellen. Im Vergleich mit den WKY Tieren ist die Anzahl dieser Zellen in den Kortices der SHR (**E und F**) deutlich vermindert. Ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den SHR Kontrolltieren (**E**) und den mit Apocynin behandelten SHR (**F**) ließ sich nicht nachweisen.

G,H,I Renin Immunreaktivität (Peroxidase-Antiperoxidase Reaktion mit Biotin-Streptavidin basierter Signalverstärkung). Dargestellt wird ein normales Expressionsprofil in WKY (**G**), eine deutlich verminderte Signalintensität in den unbehandelten SHR (**H**) und eine weitere Reduktion der Signalintensität in den JGA der mit Apocynin behandelten SHR (**I**).

J,K,L die Renin mRNA In situ Hybridisierung zeigt ein kräftiges Signal in den afferenten Arteriolen von WKY Kontrolltieren (**J**); eine deutlich verminderte Signalintensität in den unbehandelten SHR (**K**) und in den mit Apocynin behandelten SHR (**L**). Signifikante Unterschiede zwischen den beiden SHR Gruppen waren weder in der Anzahl der positiven JGA noch in der Signalintensität zu beobachten.