

1 EINLEITUNG:

Diese Studie beschäftigt sich mit der Frage, welche Rolle das L-Arginin-/NO-System in der Pathogenese der chronisch-progredienten Niereninsuffizienz spielt. Es wurde in diesem Zusammenhang der Versuch unternommen, den Verlauf einer experimentellen Glomerulonephritis durch diätetische Restriktion bzw. Supplementation von L-Arginin und Protein zu modifizieren.

1.1 Klinische Aspekte:

1.1.1 Allgemeines:

Die Pathogenese der chronisch-progressiven Niereninsuffizienz ist noch unzureichend geklärt und ihre Therapie stellt auch heute noch eine der großen Herausforderungen in der modernen Medizin dar. Der relativ niedrigen Inzidenz von 40-60/100.000 Fällen im Jahr stehen geschätzte Kosten in der Größenordnung von etwa 2% des Gesundheitsbudgets eines europäischen Staates für die Langzeit-Therapie der Erkrankung und ihrer Folgen gegenüber^{1,2}, die Gesamtkosten für die Therapie der terminalen Niereninsuffizienz betragen in den USA 1996 14,5 Milliarden US-Dollar³.

Der Verlauf der Erkrankung ist durch eine irreversible Abnahme des Glomerulumfiltrats bei progressivem Untergang von Nierengewebe gekennzeichnet, und dieser Prozeß ist dabei unabhängig von der auslösenden Grunderkrankung. Diese sind in den Fällen von terminaler Niereninsuffizienz, also dem funktionellen Ausfall der Nieren, zu 40% die diabetische Nephropathie, zu 25% die chronische Glomerulonephritis, in bis zu 15% die hypertensive Nephrosklerose und anteilmäßig weniger bedeutende Erkrankungen wie die interstitielle Nephritis, die Analgetika-Nephropathie, die chronische Pyelonephritis oder die polyzystische Nierenerkrankung.

1.1.2 Therapeutische Prinzipien^{4,5}:

Das zentrale Problem bei der Therapie der chronischen Niereninsuffizienz ist neben der Tatsache der Symptomarmut vieler isoliert glomerulärer Erkrankungen der bislang unaufhaltsame chronisch-progrediente Verlauf der Erkrankung, der früher oder später in die terminale Niereninsuffizienz führt. Ziel einer Therapie kann deshalb bislang nur eine Verzögerung der Progredienz der Erkrankung und eine bestmögliche Versorgung ihrer klinischen Folgen sein.

In seltenen Fällen, wie z.B. bei chronischer Pyelonephritis, ist eine Behandlung der renalen Grunderkrankung (z.B. Antibiose) möglich.

Als supportive Maßnahme ist heute eine Reduktion der Eiweißzufuhr durch diätetische Maßnahmen etabliert, allerdings ist der Mechanismus ihrer nachgewiesene Wirkung bislang nicht geklärt, obwohl verschiedene Hypothesen dazu entwickelt wurden^{6,7,8,9,10,11}. Eine mögliche Erklärung könnte dabei der Entzug von im Protein enthaltenen L-Arginin als Substrat verschiedener relevanter Stoffwechselwege sein (s. unten).

Weiterhin ist eine strenge Therapie eines bestehenden Hypertonus indiziert. Hierbei spielen ACE-Hemmer und wahrscheinlich in Zukunft auch AT₁-Rezeptor-Antagonisten die Hauptrolle, ihre Wirksamkeit in der Therapie ist dabei gut belegt^{12,13,14}. Ansonsten muß die Therapie symptomatisch bleiben und die vielfältigen Folgen der verminderten Nierenfunktion ausgleichen. Im Endstadium der Erkrankung, der terminalen Niereninsuffizienz, bleiben als einzige Therapieoptionen die Dialyse oder die Nierentransplantation.

Alle genannten therapeutischen Maßnahmen verhindern nach wie vor nicht die Progredienz der Nierenerkrankung, sondern führen lediglich zur Verlangsamung ihrer Progression, so daß ein Fortschreiten in die terminale Niereninsuffizienz und damit die Pflicht zu Dialyse oder Nierentransplantation bis heute nicht verhindert werden können.

Es besteht demnach großer Forschungsbedarf, die Mechanismen, die zur Entstehung, Chronifizierung und Progredienz der Erkrankung führen, verstehen zu lernen, um daraus neue, vielleicht sogar einmal kausale Therapiemöglichkeiten ableiten und entwickeln zu können.

1.2 Theoretisch-experimentelle Grundlagen:

1.2.1 Allgemeines:

Es erscheint bemerkenswert, daß verschiedenartige chronische Erkrankungen der Niere mit unterschiedlichen Ätiologien und pathogenetischen Vorgängen in einem gemeinsamen sklerotischen, nahezu funktionslosen Zustand der Niere enden („Schrumpfniere“), der im allgemeinen keine Aussage darüber zuläßt, welche Nierenerkrankung ursprünglich vorlag. Diese Beobachtung läßt den Schluß zu, daß die Niere scheinbar über ein limitiertes Repertoire an Reaktionen auf schädigende Einflüsse verfügt und auf viele sehr unterschiedliche Noxen ähnlich reagiert.

Desweiteren läßt sich zumindest im Tiermodell zeigen, daß die Niereninsuffizienz auch dann noch progredient verläuft, wenn der ursprüngliche auslösende Stimulus beendet wurde. Daraus läßt sich folgern, daß in der Niere selbst irreversible Mechanismen in Gang gesetzt werden, die die Erkrankung unterhalten und deshalb auch an der Niere charakterisiert werden müssen¹⁵. Es erscheint demnach vielversprechend, diese nierenimmanenten, „sich selbst unterhaltenden“, perpetuierenden Mechanismen der chronischen Niereninsuffizienz verstehen zu lernen und für die Therapie nutzbar zu machen.

Am Glomerulus ist eine Vielzahl von Faktoren bekannt, die einen biologischen Schaden setzen, unterhalten oder begünstigen können, doch trotz ihrer sehr unterschiedlichen Entität münden die durch sie initiierten Reaktionen fast stets in eine Glomerulosklerose und schließlich auch in eine interstitielle Fibrose. Die damit einhergehende Fibrosierung kann in diesem Zusammenhang u.U. als defekte, weil nicht terminierte, Wundheilung verstanden werden.

1.2.2 Pathogenetisch relevante Mediatoren:

Schon seit längerem wird einer Vielzahl von Mediatoren sowohl aus lokalen glomerulären als auch aus infiltrierenden Zellen, bei denen es sich in erster Linie um Makrophagen handelt, eine entscheidende Rolle in der Pathogenese der Glomerulosklerose zugeschrieben.

Einer der wichtigsten in diesem Zusammenhang zu nennenden Faktoren ist der

platelet derived growth factor (PDGF) aus infiltrierenden Makrophagen, Mesangial- und Endothelzellen. So wurde gezeigt, daß PDGF ein Mitogen kultivierter Mesangialzellen darstellt, sowohl in experimenteller als auch humaner Glomerulonephritis mit Mesangialzellproliferation exprimiert wird und seine Infusion bzw. Hemmung bei experimenteller Glomerulonephritis die Mesangialzellproliferation verstärkt bzw. reduziert und deshalb als pathogenetisch relevanter Wachstumsfaktor bei der Glomerulosklerose zu gelten hat¹⁶.

Desweiteren beschäftigte sich die Gruppe um W. Border intensiv mit der Bedeutung des Wachstumsfaktors *transforming growth factor-β* (TGF-β) für die glomeruläre Fibrosierung. Diese Untersuchungen ergaben, daß TGF-β direkt die Genexpression von Matrixproteinen wie Kollagenen, Fibronektin und Proteoglykanen induziert, weiterhin die Aktivität von Proteinase-Inhibitoren wie PAI-1 hochreguliert und die Expression von Integrinen, die eine Bedeutung für die Zusammensetzung extrazellulärer Matrix haben, kontrolliert. Die TGF-β-Expression bei experimentellen Nierenerkrankungen korrelierte mit der glomerulären Expression von Matrixproteinen, die spezifische Hemmung des Wachstumsfaktors reduzierte Matrixakkumulation und Glomerulosklerose und die Überexpression von TGF-β wurde auch bei humanen Nierenerkrankungen nachgewiesen^{17,18,19}.

Weitere Faktoren, denen eine pathogenetisch relevante Rolle im Krankheitsgeschehen chronischer Glomerulosklerose zugeschrieben wird, sind Thromboxan A₂ aus Makrophagen und Thrombozyten, Heparinase und verschiedene Interleukine, deren Bedeutung aber weniger genau belegt ist. Im Zusammenhang mit den am geschädigten Glomerulus veränderten physikalischen Kräften und dem profibrotischen Charakter von Angiotensin II wird außerdem dem Renin-Angiotensin-System zentrale Bedeutung im Krankheitsgeschehen zugeschrieben (siehe 4.2.2)¹⁵. Auch eine erhöhte Matrixdegradation (PAI-1-Überexpression) scheint bei der Pathogenese der Glomerulosklerose eine entscheidende Rolle zu spielen^{20,21,22}.

Die glomeruläre Überexpression von PDGF und TGF-β konnte experimentell durch diätetische Proteinrestriktion gehemmt werden, wobei die Krankheit auch einen günstigeren Verlauf zeigte²³. Die Expression von TGF-β wird darüberhinaus durch diätetische Restriktion von L-Arginin vermindert²⁴. Diese Studien waren die Grundlage für unsere Hypothese, daß der glomeruläre Argininstoffwechsel,

insbesondere das L-Arginin-/NO-System, pathophysiologisch relevant für glomeruläre Erkrankungen sein könnten, zumal sich seit einigen Jahren die Befunde mehren, daß die infiltrierenden Makrophagen und das von ihnen produzierte Stickstoffmonoxid (NO) einen zentralen Beitrag zu der glomerulären Schädigung und der ablaufenden Entzündung in verschiedenen experimentellen Glomerulonephritis-Modellen zu leisten scheint. Dieses System, mit dem sich diese Arbeit schwerpunktmäßig beschäftigt, und die veröffentlichten Ergebnisse anderer Arbeitsgruppen zu diesem Thema werden nachfolgend ausführlicher vorgestellt.

1.2.3 Das L-Arginin-/NO-System:

1.2.3.1 Historischer Überblick:

1980 entdeckten Furchgott und Zawadski, daß ein intaktes Endothel für die acetylcholininduzierte Dilatation glatter Gefäßmuskelzellen notwendig ist. Es wurde postuliert, daß vom Endothel eine Substanz synthetisiert wird, die für diesen Effekt verantwortlich ist und diese zunächst als *endothelium derived relaxing factor* (EDRF) bezeichnet²⁵. 1987 identifizierten nahezu zeitgleich mehrere Gruppen, daß EDRF mit Stickstoffmonoxid (NO) identisch ist^{26,27}. Seitdem ist der L-Arginin-/NO-Stoffwechsel ein in der medizinischen Forschung intensiv bearbeitetes Gebiet. Furchgott und Ignarro wurden 1998 für ihre Erkenntnisse im Bereich der NO-Biologie mit dem Nobelpreis für Medizin ausgezeichnet²⁸.

1.2.3.2 Die Familie der NO-Synthasen^{29,30,31,32,33,34,35,36}:

Die semi-essentielle Aminosäure L-Arginin wird durch NO-Synthasen (NOS) zu L-Citrullin und NO verstoffwechselt. Von diesen Enzymen sind im Laufe der Jahre verschiedene Unterformen entdeckt worden. Grundsätzlich zu unterscheiden sind konstitutive und induzierbare NOS (iNOS). Von den konstitutiven NOS ist einerseits eine endotheliale (eNOS) und andererseits eine neuronale (nNOS) Form des Enzyms bekannt. Der grundsätzliche biologische Unterschied der NOS-Unterformen scheint darin zu bestehen, daß die konstitutiven NOS durch biologische Stimuli für einen begrenzten Zeitraum im Bereich von Sekunden NO in der Größenordnung von

picomolaren Konzentrationen synthetisieren können, während die iNOS nach Induktion in der Lage ist, für Stunden bis Tage NO in nanomolaren, also drei bis vier Zehnerpotenzen höheren, Konzentrationen zu produzieren. Die konstitutiv exprimierten Isoformen sind dabei absolut Calmodulin-abhängig, unterliegen also einer Kontrolle durch den intrazellulären Ca^{2+} -Stoffwechsel.

Die biologische Funktion der ecNOS liegt in der Regulation der lokalen und systemischen Hämodynamik. Die Wirkungen des durch sie bereitgestellten NO werden v.a. durch eine Aktivierung der löslichen Form der Guanylatcyclase und einen darauf folgenden Anstieg der intrazellulären cGMP-Konzentration in den glatten Muskelzellen der Gefäße verursacht. Das Ergebnis ist u.a. eine über cGMP-abhängige Proteinkinasen gesteuerte Vasodilatation³⁷.

	ecNOS (TypIII)	bNOS (TypI)	iNOS (TypII)
Genlokus	Chromosom 7	Chromosom 12	Chromosom 17
Molekulargewicht	135000 D	160000 D	130000 D
Enzymlokalisierung	membrangebunden/ zytosolisch	zytosolisch	zytosolisch
Ca²⁺-/Calmodulin- Abhängigkeit	Ja	Ja	Nein
Stimulatoren	Acetylcholin, Bradykinin, Thrombin, „Shear stress“ etc.	L-Glutamat, Lithium etc.	IL-1 β , IFN- γ , TNF- α und - β , LPS etc.
Inhibitoren	L-NMMA, L-NAME etc.	L-NMMA, L-NAME, 7-Nitroindazol etc.	L-NMMA, L-NAME, L-NIL, Aminoguanidin, Dexamethason etc.
NO-Produktion	pmol (sec)	pmol (sec)	nmol (h bis d)
biol. Wirkungen des produzierten NO	Vasodilatation, Thrombo-Aggregationshemmung u.a.	Neurotransmission, penile Erektion	Zytotoxizität, DNA-Schädigung, Enzymnitrosylierung u.v.a.
Lokalisation in der Niere	Endothel der Arteriolen	Macula densa	infiltrierende Makrophagen, Tubuluszellen, Mesangialzellen in vitro

Tabelle 1-1: Charakterisierung der NOS-Isoformen

Das von der bNOS produzierte NO hat v.a. Bedeutung für Vorgänge während der Neurotransmission. Ihm werden eine wichtige Rolle für die Gedächtnisfunktion im

Hippocampus und bei der penilen Erektion zugeschrieben²⁹.

Die iNOS wurde zunächst in Makrophagen entdeckt, scheint aber auch in anderen Körperzellen exprimiert zu werden^{35,38,39}. Die NO-Synthese in den von der iNOS bereitgestellten hohen Gewebskonzentrationen scheint eine wichtige Rolle in der unspezifischen Immunabwehr zu spielen.

Die Unterschiede der NOS-Isoformen und ihre biologischen Wirkungen werden in Tabelle 1-1 zusammengefaßt.

1.2.3.3 NO und die Niere:

Die verschiedenen Isoformen der NO-Synthasen werden in der Niere an unterschiedlichen Stellen exprimiert, so daß sie in der Physiologie und Pathophysiologie der Niere eine jeweils unterschiedliche Rolle spielen dürften.

Die ecNOS ist im Endothelium renaler Arteriolen, so auch dem glomerulären Endothel, lokalisiert. Die NO-Synthese an dieser Stelle spielt wahrscheinlich eine Rolle in der Regulation der glomerulären Hämodynamik und stellt vermutlich ein zentrales vasodilatatorisches System v.a. im Bereich der efferenten Arteriole dar.

Die renale bNOS ist streng in der Macula densa lokalisiert und scheint in der Regulation der Renin-Sekretion und über diesen Umweg ebenfalls in der Regulation des tubuloglomerulären Feedbacks und der renalen Hämodynamik eine wichtige Rolle zu spielen^{37,40}. Näheres zum Bereich Renin-Angiotensin-System, seiner Interaktion mit dem NO-System und seiner Bedeutung in der Pathogenese von Glomerulosklerose wird im Diskussionsteil dieser Arbeit dargestellt.

Eine renale NO-Produktion durch die iNOS spielt v.a. im Rahmen von verschiedenen experimentellen Nephritis-Modellen eine wichtige Rolle^{41,42,43,44,45,46,47}. Sie ist dabei v.a. in Makrophagen exprimiert, die die Glomeruli im Rahmen der entzündlichen Reaktion infiltrieren^{48,49,50}.

1.2.3.4 Andere Stoffwechselwege von L-Arginin:

Neben den verschiedenen NOS-Isoformen mit den oben beschriebenen Wirkungen dient L-Arginin auch anderen Enzymen als Substrat^{18,51,52}. So spaltet das Enzym Arginase L-Arginin in L-Ornithin und Harnstoff. Der Arginase-Weg ist unter anderem

deshalb interessant, weil bekannt ist, daß er unter Umständen mit der durch die NO-Synthasen katalysierten Reaktion um das Substrat L-Arginin in Konkurrenz stehen oder eine Regelfunktion auf diese ausüben könnte (siehe 4.2.3)^{41,51,53,54}.

Das bei der Arginase-Reaktion bereitgestellte Ornithin wird durch das Enzym Ornithin-Decarboxylase (ODC) zu Putrescin und dieses weiter zu Spermin und Spermidin verstoffwechselt. Diese drei Substanzen spielen als sogenannte Polyamine bei der DNA- und Proteinsynthese und damit im Bereich von Zellwachstum und -reparatur eine wichtige Rolle^{55,56}. Außerdem wird L-Ornithin über einen parallelen Enzymschritt von der Ornithinaminotransferase (OAT) zu L-Prolin weitersynthetisiert⁵⁵, das bekanntermaßen eine wichtige Bedeutung für die Kollagensynthese und damit für die Bindegewebsbildung hat, da ca. 12% des Kollagenmoleküls aus Hydroxyprolin bestehen. Im Rahmen von fibrosierenden Prozessen könnte vor diesem Hintergrund das Ausmaß der Prolinbiosynthese bedeutsam sein.

Ein weiteres Enzym, das L-Arginin abbaut, ist die Arginin-Decarboxylase (ADC). Bei diesem Schritt entstehen Agmatin und CO₂, wobei die Bedeutung von Agmatin noch weitgehend unklar ist⁵⁷.

Abb.1-1 faßt die Stoffwechselwege von L-Arginin noch einmal zusammen.

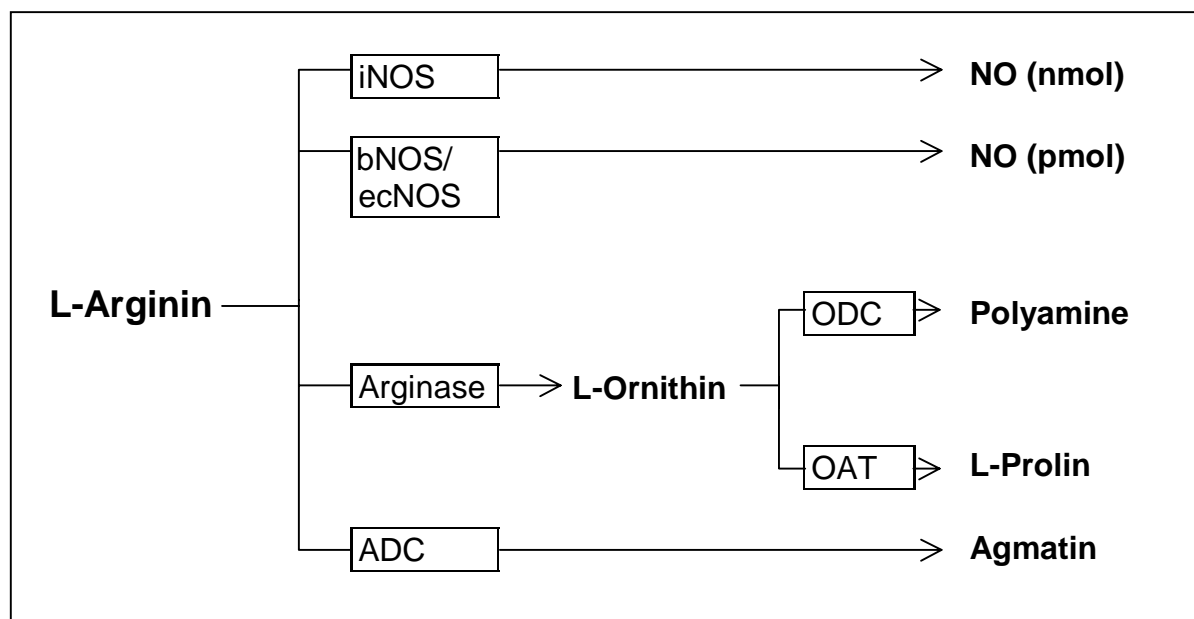


Abb.1-1: L-Arginin-Stoffwechsel

1.3 Vorangehende Versuche und Fragestellung:

In Vorversuchen untersuchten wir zwei Stämme von Lewis-Ratten (s. 2.1.2), die nach Injektion des Thy1-Antikörpers einen unterschiedlichen Verlauf der dadurch induzierten Glomerulonephritis zeigten:

Der Stamm eines holländischen Züchters aus Maastricht (LEW/Maa) reagierte nach einmaliger Injektion des Thy1-Antikörpers mit einer chronisch-persistierenden Glomerulosklerose bei einer generell gesteigerten Inflammationsreaktion⁵⁸. Im Vergleich zu einem Stamm aus Dänemark (LEW/Moe), der eine besonders rasche Ausheilung zeigte, war hier die iNOS-Expression initial erhöht und die bNOS-Expression initial und zu jedem Zeitpunkt gesteigert nachzuweisen, während jedoch keine Unterschiede in der ecNOS-Expression meßbar waren⁵⁹. Diese Befunde stützten die Vermutung, daß eine insgesamt höhere „Aktivierung“ des NO-Systems eine Chronifizierung des Krankheitsgeschehens begünstigen könnte.

In unserer Untersuchung wurden LEW/Maa-Ratten als Versuchstiere eingesetzt, da deren Krankheitsverlauf dem bei humaner Glomerulonephritis beobachteten ähnlicher ist und somit u.U. ein besseres Modell für die menschliche Pathophysiologie darstellt.

Um die Frage zu klären, ob für den Verlauf der Krankheit die initiale Schädigung der Glomeruli durch den Antikörper oder die dadurch sekundär in Gang gesetzten Reaktionen von größerer Bedeutung sind, unternahmen wir zwei parallele Versuche: Wir fütterten Ratten des LEW/Maa-Stammes mit Diäten, in denen alternativ der Gehalt an Arginin und/oder Protein reduziert bzw. Arginin supplementiert wurden.

In der einen Versuchsreihe wurden die Tiere in der Frühphase der Erkrankung, also zum Zeitpunkt der initialen Entzündungsreaktion, mit den Diäten ernährt, um gewissermaßen einen „präventiven“ Effekt auf den nachfolgenden Krankheitsverlauf beobachten zu können („Präventionsstudie“).

In der parallelen Versuchsreihe, die Gegenstand dieser Arbeit ist, wurden die Diäten in der Regressionsphase der Erkrankung, also zu einem Zeitpunkt, in dem die initiale inflammatorische Schädigung des Glomerulus bereits abgelaufen war, verabreicht, um zu ermitteln, ob diese Maßnahme die Reparatur- und Fibrosierungsprozesse im späten Krankheitsverlauf beeinflusst („Regressionsstudie“).

Durch dieses Studiendesign sollte die Frage beantwortet werden, ob es nur für den

Krankheitsverlauf entscheidend ist, ob man in der akuten Entzündungsphase therapeutisch eingreift oder auch die Möglichkeit besteht, nach den initialen Prozessen in der Chronifizierungsphase einen Einfluß auf das Krankheitsgeschehen auszuüben, ob es also einen „*point of no return*“ gibt, nach dem ein Eingreifen wirkungslos ist.