

## **4 DISKUSSION:**

Ziel dieser Studie war es, bei einem Rattenstamm (LEW/Maa), der bekanntermaßen nach intravenöser Injektion des Thy1-Antikörpers eine chronische Glomerulonephritis entwickelt und sich damit einzigartig von beinahe allen anderen experimentellen Glomerulonephritis-Modellen unterscheidet, da diese beinahe ausnahmslos ausheilen und damit eher Vorgänge der intakten Wundheilung widerspiegeln<sup>65,66</sup>, zu unterscheiden, ob für die Mechanismen dieser Chronifizierung eher die Vorgänge in der akuten Frühphase der Erkrankung oder das Geschehen in der späten Phase der Entzündung, also zu einem Zeitpunkt, zu dem die akuten inflammatorischen Gewebs- und Funktionsveränderungen bereits initiiert bzw. abgeschlossen waren, entscheidend sind.

Dazu wurde in zwei parallelen Versuchen einmal in der Frühphase der Erkrankung im Sinne eines präventiven Ansatzes diätetisch eingegriffen, bevor die Krankheit induziert wurde („Präventionsstudie“). In dem hier vorliegenden Teil der Studie wurde die Fragestellung auf ein Eingreifen in der Phase der Regression fokussiert („Regressionsstudie“), dabei lag besonderes Augenmerk neben der Objektivierung des Nierenschadens und der Floridität der Entzündung auf der Untersuchung des späten zeitlichen Verlaufes der Krankheit und der Aktivität des L-Arginin-/NO-Stoffwechsels, speziell der bNOS-katalysierten NO-Produktion, sowie der Aktivität des Renin-Angiotensin-Systems.

### **4.1 Interpretation der Ergebnisse:**

#### **4.1.1 Histo-Score:**

Die Auswertung der histologischen Schnitte zeigt, daß bei allen Tieren, die eine Antikörperinjektion erhalten hatten, die Glomerulonephritis erfolgreich induziert worden war (siehe Tabelle 3-2): Die Tiere zeigten deutlich erhöhte Sklerosewerte nach einem Krankheitsverlauf von 1 Monat, die sich nach 2 und 4 Monaten besserten, doch auch nach dieser Zeit waren die Sklerose-Indizes der kranken Tiere immer noch signifikant gegenüber denen der nierengesunden, ebenfalls 4 Monate alten, Tiere gesteigert.

Es fanden sich also, wie erwartet, die Befunde einer chronischen Glomerulonephritis in der Phase der Fibrosierung.

Die Diäten hatten nach dieser Analyse keinen Einfluß auf den Krankheitsverlauf, die Werte der verschiedenen Diätgruppen wichen zu den verschiedenen Zeitpunkten nicht signifikant voneinander ab.

#### **4.1.2 Albuminurie:**

Die Ergebnisse der histologischen Analyse werden von denen der Albuminurie-Messungen bestätigt: Die Glomerulonephritis ist in allen in Frage kommenden Tieren erfolgreich induziert worden, d.h. alle Tiere, die eine Injektion mit dem Thy1-Antikörper erhalten hatten, schieden erhöhte Mengen von Albumin mit dem Urin aus. Dieses gilt auch für die Tiere nach viermonatigem Krankheitsverlauf, deren Werte signifikant über denen der Kontrollgruppe lagen. Die Diät hatte dabei keinen relevanten Einfluß auf den Krankheitsverlauf.

Im Ergebnisteil wurde dargestellt, daß zu verschiedenen Meßzeitpunkten einige Diätgruppen signifikante Abweichungen in der Albuminausscheidung gegenüber anderen Gruppen zeigten. Dazu ist kritisch anzumerken, daß es sich bei den Messungen zu den verschiedenen Zeitpunkten nicht um dieselben Tiere im zeitlichen Verlauf, sondern um jeweils individuell verschiedene Tiere handelte, die zu den entsprechenden Zeitpunkten geopfert wurden. Entsprechend kann eine individuell höhere Vulnerabilität einzelner Tiere gegenüber der Antikörper-Injektion bei einer ohnehin schon relativ hohen Schwankungsbreite des Parameters zu stärkeren Streuungen führen, die bei einer Gruppengröße von 4 Tieren statistische Signifikanz erreichen. Diese errechenbaren Signifikanzen sind in diesem Falle allerdings mit Vorsicht zu interpretieren, da sie wahrscheinlich pathophysiologisch ohne Bedeutung sind.

Diese Annahme wird außerdem dadurch gestützt, daß die Diätgruppen, die mit ihren Albuminwerten signifikant höher bzw. niedriger liegen als andere, zu verschiedenen Meßzeitpunkten unterschiedliche sind (z.B. -P-A 1M in Abb.3-4 vs. +P+A 2M in Abb. 3-5). In dem von uns parallel durchgeführten Präventionsteil der Studie zeigte sich außerdem, daß hier zu den frühen Zeitpunkten Unterschiede zwischen den Albuminausscheidungen im Urin der verschiedenen Diätgruppen meßbar waren, die

z.T. einen Unterschied um einen Faktor 5 ausmachten<sup>79</sup>. Die von uns gefundenen Unterschiede sind demnach auch zu klein, um im Rahmen des Krankheitsgeschehens eine relevante Bedeutung zu haben.

Zusammenfassend läßt sich also in der hier vorliegenden Studie kein pathophysiologisch relevanter Einfluß der Diäten auf den Krankheitsverlauf nachweisen.

#### **4.1.3 Glomeruläre Nitrat-/Nitrit-Produktion:**

Auch bei diesen Messungen zeigten sich statistisch signifikante Abweichungen einzelner Werte gegenüber anderen des gleichen Meßzeitpunktes. Für diese Befunde gilt Ähnliches wie das oben Gesagte. Die gemessenen Unterschiede sind, verglichen mit den sicherlich relevanten Unterschieden, die in der Präventionsstudie gezeigt werden konnten, die auch hier um bis zu ein Fünffaches zwischen einzelnen Gruppen ausmachten, nicht groß genug, um pathophysiologisch relevant zu sein. Auch bei diesen Messungen erreichten die Werte immer unterschiedlicher Diätgruppen zu den verschiedenen Zeitpunkten statistische Signifikanz, die entsprechend vorsichtig zu bewerten ist.

Zusammenfassend ist also auch kein pathophysiologisch relevanter Einfluß der Diäten auf die NO<sub>x</sub>-Produktion in den Glomeruli zu erkennen. Die Werte variieren nicht signifikant über den Krankheitsverlauf, nach 4 Monaten ist keine NO<sub>x</sub>-Produktion meßbar, die eindeutig über der der Kontrolltiere liegt.

Diese Befunde sind darauf zurückzuführen, daß die massive NO-Produktion durch die iNOS in der initialen Entzündungsphase der Krankheit zu den hier gemessenen Zeitpunkten (ab 1 Monat) nicht mehr stattfindet<sup>51</sup>. Die hier gemessenen Nitrat-/Nitritkonzentrationen sind dabei als glomeruläre „Basisproduktion“ von NO, wahrscheinlich vornehmlich katalysiert durch eNOS und bNOS und damit im picomolaren Bereich liegend, aufzufassen, die sich durch Veränderungen der L-Arginin-/Proteinzufuhr nicht nachweisbar beeinflussen ließ.

#### **4.1.4 bNOS-/Renin-mRNA-Expression:**

Die Ergebnisse der Messungen der bNOS-mRNA zeigten eine konstante Expression des Enzyms über den gesamten Krankheitsverlauf, die sich durch die diätetische Modifikation der Substratzufuhr nicht beeinflussen ließ (siehe Abb. 3-11).

Die mRNA für Renin wurde ebenfalls konstant über den gesamten Versuchszeitraum exprimiert, zum Zeitpunkt 1 Monat zeigte sich eine gegenüber den anderen Diätgruppen signifikant gesteigerte Expression in der Gruppe -P-A (siehe Abb. 3-12). Diese gesteigerte Expression ließ sich jedoch nicht mit der bNOS-Expression korrelieren, nach unseren Ergebnissen läßt sich demnach kein Zusammenhang zwischen Renin- und bNOS-Expression herstellen.

Allerdings ist die signifikante Heraufregulation der Renin-Expression unter Proteinentzug sicherlich, unabhängig von der bNOS-Expression, pathogenetisch bedeutsam, scheinbar bewirkt die Reduktion der diätetischen Proteinzufuhr hier eine Heraufregulation der Renin-mRNA-Synthese durch andere, d.h. bNOS-unabhängige, Mechanismen (siehe 4.2.2).

#### **4.1.5 Arginase-Aktivität:**

Die Meßwerte der 1M-Tiere zeigen, daß die Arginase-Aktivität zu diesem Zeitpunkt von den Diäten beeinflußt wurde: Die Gruppe mit der höchsten L-Arginin-Zufuhr zeigte den höchsten Umsatz, eine Reduktion der L-Arginin-Zufuhr führte zur verminderten Aktivität; auch eine (zusätzliche) Reduktion der Gesamtproteinzufuhr reduzierte die Arginase-Tätigkeit noch weiter (siehe Abb. 3-10). Dies steht in Übereinstimmung mit der Eigenschaft des Enzyms, seine Aktivität in Abhängigkeit vom quantitativen Substratangebot zu regulieren.

Die Werte der Kontrollgruppe zeigten allerdings im Mittel eine deutlich höhere Aktivität der glomerulären Arginase, als dies bei den kranken Tieren der Fall war; der Umsatz des Enzyms wurde durch die Krankheit demnach eher herabreguliert; dies und die Tatsache, daß sich die gemessenen Unterschiede in der Enzymaktivität nicht in funktionellen oder morphologischen Unterschieden im Rahmen der Nierenerkrankung niederschlugen, läßt eine pathophysiologische Bedeutung dieses Befundes, zumindest im Sinne einer erhöhten Bereitstellung von Matrixkomponenten

durch die Arginase, unwahrscheinlich erscheinen (siehe 4.2.3), im Gegenteil könnte hier spekuliert werden, ob die erniedrigte Arginase-Aktivität einer effektiven, koordinierten Wundheilung in der Spätphase dieses Modells im Wege steht.

#### **4.1.6 Aktivität der Ornithin-Decarboxylase (ODC):**

Als einzige Auffälligkeiten erreichten die höheren Meßwerte für -P+A 1M (Abb. 3-13) und die niedrigeren Meßwerte für -P+A 4M (Abb. 3-15) Signifikanz gegenüber den anderen Diätgruppen. Da aber auch hier die Unterschiede der Werte sehr gering waren und die signifikant abweichenden Gruppen, ähnlich wie bei obigen Messungen, zu den verschiedenen Zeitpunkten jeweils andere sind, müssen diese Befunde entsprechend zurückhaltend beurteilt werden und haben sicherlich keine pathophysiologische Bedeutung.

Im Fazit finden sich also für den Umsatz der renalen Ornithin-Decarboxylase keine relevanten Unterschiede über den gesamten Versuchszeitraum, ein Einfluß auf ihre Aktivität durch die Diät ist damit nicht nachweisbar.

#### **4.1.7 Serumspiegel der Aminosäuren:**

Bei der Analyse der Werte für die verschiedenen Serum-Aminosäuren fällt auf, daß nach 1 und 2 Monaten eine Reduktion der Proteinzufuhr regelmäßig einen gegenüber der Diätgruppe mit entsprechendem Arginin-, aber normalem Proteingehalt signifikant erhöhten Serumspiegel der von uns untersuchten Aminosäuren nach sich zieht. Überraschenderweise scheint hier also eine Proteindepletion eine erhöhte Aminosäurebiosynthese hervorzurufen. Die 4M-Tiere zeigen diesen Effekt weniger ausgeprägt, hier scheint es zu einem Ausgleich der entsprechenden Aminosäurespiegel, wahrscheinlich durch eine adaptative Steigerung ihrer Biosynthese, zu kommen. Desweiteren fällt auf, daß bei den Kontrolltieren dieser Effekt nicht zu Tage tritt; das beschriebene Phänomen ist also scheinbar mit der Erkrankung der Niere verbunden. Der hier beobachtete Verlauf der Serumspiegel ist außerdem auch in der parallelen Präventionsstudie nachweisbar<sup>80</sup>. Eine ausführliche Diskussion dieser Ergebnisse, auch im Vergleich mit anderen Studien, folgt unter 4.2.4: „Serum-Aminosäuren und „low-protein“-Diät“.

#### **4.1.8 Zusammenfassung:**

Unsere Ergebnisse zeigen zusammenfassend, daß eine Modifikation der diätetischen Arginin- und Protein-Zufuhr in der Spätphase der chronischen aThy1-Glomerulonephritis bei LEW/Maa-Ratten den Krankheitsverlauf nicht mehr entscheidend zu beeinflussen vermag. Das Ausmaß des renalen Schadens war in den verschiedenen Diätgruppen nicht signifikant verändert und die Aktivitäten der verschiedenen Stoffwechselwege von L-Arginin waren nicht pathophysiologisch relevant beeinflussbar. Auch die Expression der bNOS ließ sich durch die Diät nicht verändern, die erhöhte Renin-Expression der Tiere der 1M-Gruppe unter Proteindepletion ist durch andere, d.h. bNOS-unabhängige, Mechanismen zu erklären.

In der parallel durchgeführten Präventionsstudie zeigten sich hingegen deutliche Modifikationen des Krankheitsverlaufes durch die Diäten. So war dort der initiale entzündliche renale Schaden der Tiere, die eine L-Arginin-supplemetierte Diät erhalten hatten, am größten; dies ließ sich durch die histologischen Analysen und die Messung der Albuminurien bestätigen. Ferner fanden sich bei diesen Tieren die höchsten Werte einer glomerulären Nitrat- und Nitrit-Produktion, die Aktivitäten der Arginase und der ODC waren signifikant gesteigert und die iNOS-mRNA-Expression war signifikant am höchsten, hier war also der L-Arginin-/NO-Stoffwechsel deutlich, und durch L-Arginin-Supplementation stimulierbar, heraufreguliert<sup>81</sup>. Somit erscheint in diesem Tiermodell der einmal etablierte glomeruläre Schaden nicht mehr reversibel.

#### **4.2 Vergleich mit anderen Studien:**

##### **4.2.1 L-Arginin-/NO-System:**

###### **4.2.1.1 ecNOS:**

Die verschiedenen Isoenzyme des NO-Systems haben im Bereich der renalen Physiologie und Pathophysiologie unterschiedliche Funktion und Bedeutung:

Die renale ecNOS spielt v.a. im Bereich der lokalen Gefäßregulation und der

glomerulären Hämodynamik eine Rolle. Die durch ihre NO-Produktion vermittelten Effekte sind die Dilatation glatter Gefäßmuskulatur, aber auch die intravaskuläre Thrombozyten-Aggregationshemmung<sup>82</sup>. Eine Aktivierung der ecNOS, z.B. durch Infusion hochdosierten Substrats L-Arginin, führt zu einer NO-abhängigen Vasodilatation und damit zu einer Erhöhung des effektiven renalen Plasmaflusses (ERPF) und der glomerulären Filtrationsrate (GFR)<sup>37,52,83,84</sup>. An isolierten mikroperfundierten renalen Arteriolen vermittelt NO die Vasodilatation der afferenten, nicht jedoch der efferenten Arteriole und antagonisiert die Wirkung von Angiotensin II am afferenten Gefäß<sup>85,86</sup>. Es ließ sich zeigen, daß eine unspezifische NOS-Blockade mit L-NMMA in einer Dosierung, die keinen Einfluß auf den Blutdruck der Tiere hatte, nur den Widerstand der afferenten Arteriole und damit den Filtrationskoeffizienten änderte. Eine Beeinflussung des Widerstandes des Vas efferens war erst in Dosen sichtbar, die auch einen Einfluß auf den systemischen Blutdruck hatten<sup>87</sup>.

Im Rahmen dieser Studie wurden keine Messungen über die Expression oder glomeruläre Aktivität der ecNOS während der renalen Entzündung durchgeführt, da vorangegangene Studien unsere Arbeitsgruppe zeigten, daß keine Veränderungen der ecNOS-Expression über den Krankheitsverlauf und keine Einflußnahme von diätetischer Restriktion oder Supplementation von L-Arginin auf die Aktivität des Enzyms zu erwarten waren<sup>88</sup>.

#### **4.2.1.2 iNOS:**

Über die Bedeutung des durch die iNOS bereitgestellten NO im Zusammenhang mit akuten entzündlichen Vorgängen bei der akuten aThy1-GN kann kein Zweifel bestehen. Es sind reichlich Daten vorhanden, die eine Bedeutung des Systems bei der Initiation und Unterhaltung der glomerulären Entzündung belegen. So konnten Cattell et al. in der aThy1-Glomerulonephritis und verschiedenen weiteren experimentell erzeugten Modellen für Glomerulonephritis bei Ratten nachweisen, daß in der akuten Inflammationsphase in den Glomeruli reichlich NO-Produktion stattfindet und dieses aus den die Glomeruli während der Entzündung infiltrierenden Makrophagen stammt<sup>41-48</sup>.

Yamamoto et al. zeigten, daß bei der aThy1-GN bei Sprague-Dawley-Ratten zum Zeitpunkt der maximalen Mesangialzellyse auch der immunhistologische Nachweis

der iNOS maximal gelang; eine Blockade der NO-Produktion durch den NOS-Hemmstoff L-NMMA oder durch den Entzug von NOS-Substrat durch diätetische L-Arginin-Depletion senkten die Mesangialzellyse<sup>89</sup>. Narita et al. zeigten ebenfalls, daß die Gabe von L-NMMA in der Frühphase der akuten aThy1-GN zu einer reduzierten Proteinurie, einer verringerten Expression des Wachstumsfaktors TGF- $\beta_1$  und einer reduzierten glomerulären Matrixakkumulation führten<sup>90</sup> und daß ein ähnlicher, wenn auch moderaterer Effekt durch eine diätetische Restriktion von L-Arginin, also einem Substratzug für die NO-synthetisierenden Enzyme, zu erreichen war<sup>24</sup>.

Weinberg et al. zeigten in MRL-lpr/lpr-Mäusen mit spontanem autoimmunem Lupus-Syndrom, das sich durch die spontane Entwicklung einer entzündlichen Arthropathie, einer Vaskulitis und einer Immunkomplex-Glomerulonephritis auszeichnet, eine gegenüber gesunden Tieren erhöhte iNOS-Expression und glomeruläre NO-Produktion. Die perorale Gabe des NOS-Inhibitors L-NMMA reduzierte die Schwere der Manifestation der Glomerulonephritis und Arthritis der Tiere; dabei ließ sich nachweisen, daß die bei den Tieren spontan vorhandenen Anti-DNA-Antikörper durch diese Maßnahme nicht zurückgingen. Dies identifizierte NO als einen wichtigen Mediator der entzündlichen Effekte<sup>91</sup>. Allerdings zeigten nachfolgende Experimente der gleichen Arbeitsgruppe mit MRL-lpr/lpr-Mäusen, die zusätzlich homozygot bzw. heterozygot funktionslose Gene der iNOS trugen (iNOS (-/-) bzw. iNOS (+/-)), daß hier die Manifestation der entzündlichen Erkrankungen an den verschiedenen Organen nur teilweise gehemmt werden konnte: Obgleich das nachweisbare iNOS-Protein und die NO-Produktion der iNOS (-/-)-Gruppe deutlich gegenüber der Gruppe der „gengesunden“ Mäuse (iNOS (+/+)) erniedrigt war und die iNOS (+/-)-Tiere iNOS-Protein und NO in Bereichen zwischen diesen beiden Gruppen produzierten, ließen sich keine Unterschiede in der Manifestation von Glomerulonephritis und Arthritis in diesen drei Gruppen nachweisen. Sehr wohl entwickelten aber die iNOS (-/-)-Tiere deutlich weniger und mildere Vaskulitis als die Vergleichsgruppen. Auch waren die Spiegel von Rheumafaktoren, nicht aber die anderer Autoantikörper in den iNOS (-/-)-Mäusen gegenüber den anderen Gruppen vermindert<sup>92</sup>. Die Untersucher beschreiben außerdem, daß die Manifestation von Arthritis, Glomerulonephritis und Vaskulitis an das Vorhandensein unterschiedlicher Genloci gebunden ist. Es scheinen also heterogene Mechanismen für die Manifestation der verschiedenen Krankheitsentitäten verantwortlich zu sein, die



iNOS-abhängige Produktion von NO scheint hier vor allem für die Pathogenese der Vaskulitis entscheidend zu sein. Genauere Charakterisierungen der verschiedenen entzündlichen Mechanismen stehen aber noch aus.

Den oben beschriebenen Erfolgen einer NOS-Blockade im Rahmen von entzündlichen Erkrankungen stehen außerdem die Ergebnisse von anderen Untersuchern gegenüber, die negative Effekte auf den Krankheitsverlauf beobachtet haben, wenn mit hohen und kontinuierlichen Dosen von L-NMMA gearbeitet wurde<sup>93</sup>. Eine systemische, nicht-selektive Inhibition aller NOS-Formen mittels kompetitiv wirksamer L-Arginin-Analoga wie L-NMMA oder L-NAME bei Ratten führte zu einem systemischen und glomerulären Hochdruck und zu einer Senkung des ERPF und der GFR sowie bei Langzeit-Applikation zu den typischen Erscheinungen des renalen Hochdrucks<sup>83</sup>.

Auch zeigten Ergebnisse von Waddington et al., daß die intravenöse Injektion von Arginase, die zu einem kompletten L-Arginin-Entzug aus dem Serum führte, zu einer Verschlimmerung einer experimentellen nephrotoxischen Nephritis in Ratten führte. Dies geschah unabhängig vom Blutdruck oder von der Zahl der infiltrierenden Makrophagen, sondern war ein direkter hämodynamischer NO-Effekt; der Substratzug hatte hier scheinbar zu einer nachteiligen Erhöhung des glomerulokapillären Drucks geführt<sup>94</sup>. Eine Vergleichbarkeit mit unseren und den Diätstudien anderer Arbeitsgruppen ist allerdings nur eingeschränkt möglich, da hier das Vorgehen, einen Substratzug zu erreichen, wesentlich aggressiver war.

Auch eine weitere Untersuchung von Reyes et al. zeigte Effekte, die den oben beschriebenen Beobachtungen widersprachen: Die diätetische Supplementation von L-Arginin bei Ratten, die 7/8-nephrektomiert (also im Modell präterminal niereninsuffizient waren), verlangsamte hier die Progression der Krankheit<sup>84</sup>.

Hier zeigt sich der Zwiespalt einer systemischen NOS-Hemmung, sei es durch direkte pharmakologische Hemmung der NO-synthetisierenden Enzyme oder durch den Entzug ihres Substrates L-Arginin: Eine Hemmung der NO-Produktion durch die iNOS kann zu protektiven, weil entzündungshemmenden Effekten führen, allerdings wird bei zu hohen Dosen bzw. vollständigem Substratzug die NO-Synthese durch die konstitutiven Enzyme zusätzlich gehemmt, so daß der durch sie erzeugte protektive „NO-Effekt“, z.B. durch renale Vasodilatation, gleichfalls inhibiert wird. Untersuchungen mit NOS-Isoform-spezifischen Enzymblockern, die keinen

Hypertonus erzeugen, stehen noch aus und müssen abgewartet werden. Diese scheiterten bislang an der nur partiellen Selektivität der verfügbaren Substanzen (Aminoguanidin, L-NIL, 7-Nitroindazol etc.).

Da sich in vorangegangenen Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe zeigen ließ, daß zu den von uns hier untersuchten späten Zeitpunkten im Krankheitsverlauf nach 1 Monat und später die akute entzündliche Reaktion im Glomerulum erfahrungsgemäß bereits abgeklungen und deshalb nicht mehr mit einer Heraufregulation der iNOS und einer relevanten pathophysiologischen Produktion von NO durch dieses Enzym zu rechnen war<sup>95</sup>, wurde auf eine Messung der iNOS-mRNA-Expression in der hier vorliegenden Studie verzichtet.

#### **4.2.1.3 bNOS:**

Die renale bNOS ist streng in der Macula densa lokalisiert und scheint einerseits einen Einfluß auf das Tubuloglomeruläre Feedback zu haben, indem es dessen Sensitivität verändert<sup>96</sup>, außerdem potentiell in der Lage zu sein, den Tonus der efferenten und afferenten Arteriole zu modulieren, andererseits aber vor allem in der Regulation der lokalen glomerulären Renin-Sekretion eine zentrale Rolle zu spielen: So wurde anhand verschiedener pathophysiologischer Modelle eine parallele Heraufregulation von bNOS- und Renin-Expression in der Macula densa beobachtet<sup>97</sup>. Eine allgemeine NOS-Blockade ist in der Lage, die Aktivierung des Renin-Angiotensin-Systems als physiologische Reaktion zu unterdrücken<sup>98</sup>, darüberhinaus verhindert eine spezifische bNOS-Blockade mittels 7-Nitroindazol die Renin-Sekretion nach Furosemid-Gabe<sup>99</sup>. In Angiotensinogen-*knock-out*-Mäusen waren Renin- und bNOS-Expression parallel und kompensatorisch erhöht, eine bNOS-Blockade reduzierte die Renin-Expression auch in diesen Tieren<sup>100</sup>.

Der großen Menge von Untersuchungen, die eine parallele Regulation von bNOS- und Renin-Expression zeigten, steht eine Studie gegenüber, die gegenteilige Zusammenhänge nachweisen konnte: Die Behandlung von kultivierten juxtaglomerulären Zellen der Maus mit NO-Liberatoren führte zu einem frühen inhibitorischen, Guanylatzyklase-abhängigen, Effekt auf die Renin-Sekretion, der von einem stimulatorischen, Ca<sup>2+</sup>-abhängigen Effekt gefolgt wurde<sup>101</sup>.

Darüberhinaus wurden bNOS-*knock-out*-Mäuse entwickelt, um die physiologischen

Effekte der bNOS besser identifizieren und beschreiben zu können<sup>102</sup>. Die bisher veröffentlichten Studien liefern allerdings wenig Daten über die renale Physiologie dieser Tiere, da Mäuse diesbezüglich schwer zu untersuchen bzw. zu instrumentieren sind. Die Mäuse entwickeln eine Hypertrophie des Pylorus-Sphinkters, fraglich ein verstärkt aggressives Verhalten bei männlichen Tieren<sup>103</sup> und sie weisen eine erhöhte Resistenz gegen ischämische Hirninfarkte auf<sup>104</sup>.

Die Untersuchung der bNOS schien also interessant, weil ihre Rolle im Rahmen chronischer Entzündungen, v.a. im Zusammenhang mit einer evtl. Einflußnahme auf die Renin-Expression und einer evtl. Modifikation ihrer Aktivität durch ein verändertes Substratangebot, unklar und wenig untersucht ist.

Nach unseren Ergebnissen ist jedoch eine Einflußnahme auf die bNOS-Expression durch Modifikation des Substratangebotes nicht möglich. Auch läßt sich keine parallele Regulation von bNOS- und Renin-mRNA-Expression nachweisen. Die signifikant erhöhte Renin-Expression in der Gruppe von Tieren, die den niedrigsten Anteil von Protein und Arginin mit dem Futter zugeführt bekamen, ist somit sicherlich nicht auf eine Veränderung oder Steuerung durch die bNOS zurückzuführen, sondern beruht auf anderen Effekten.

#### **4.2.2 Renin-Angiotensin-System:**

Die Zusammenhänge zwischen der bNOS- und der Renin-Expression in Mesangialzellen sind deshalb bedeutsam, weil das lokale glomeruläre Renin-Angiotensin-System bzw. dessen Endprodukt, Angiotensin II, eine bedeutende Rolle bei der Initiation und Unterhaltung von fibrosierenden Prozessen zu spielen scheint. So ist einerseits ein lokaler hämodynamischer Effekt in Gestalt einer isolierten, Angiotensin-II-induzierten Konstriktion des Vas efferens nachgewiesen worden, der zu einer Erhöhung des glomerulären Filtrationsdrucks führte und damit eine Glomerulosklerose begünstigen könnte<sup>105</sup>. Auch die durch Angiotensin II hervorgerufene Kontraktion zellulärer Filamente in Mesangialzellen, die zu einer Verringerung der glomerulären Oberfläche und so zu einer Ansammlung von Makromolekülen und Immunkomplexen führte, scheint in diesem Zusammenhang pathogenetisch bedeutsam zu sein<sup>106</sup>.

Es lassen sich aber auch direkte fibrogene Effekte von Angiotensin II nachweisen:

So reagieren Mesangialzellen *in vivo* auf Angiotensin II mit Proliferation und Zunahme der Zellgröße und Proteinsynthese<sup>107</sup>. Auch die Produktion von Wachstumsfaktoren durch Mesangialzellen wie den bereits im Einleitungsteil erwähnten PDGF<sup>108</sup> und TGF- $\beta$ <sup>109</sup>, also Schlüsselmolekülen für Mesangialzellproliferation und Fibrogenese, wird angeregt. Auch *in vivo* ließen sich proliferative Matrixveränderungen im Mesangium durch direkte lokale Infusion von Angiotensin II in Dosen, die keinen Einfluß auf den systemischen Blutdruck hatten, nachweisen<sup>110</sup>. Ähnliche Ergebnisse zeigten auch Studien mit Angiotensinogen-transgenen Mäusen: Diese Tiere entwickelten eine glomeruläre Matrixexpansion und es kam zu einer  $\alpha$ -Aktin-Synthese, d.h. Phänotypänderung, in den Mesangialzellen<sup>111</sup>.

Es gibt nicht viele Daten über die Aktivität des Renin-Angiotensin-Systems bei Glomerulonephritis. Bei der Untersuchung von Nierenbiopsien von Patienten mit unterschiedlichen Glomerulonephritiden ließ sich keine erhöhte mRNA-Expression für Renin nachweisen<sup>112</sup>, allerdings lassen die eindeutigen therapeutischen Erfolge von ACE-Hemmern in der Therapie der chronischen Niereninsuffizienz einen indirekten Schluß auf die Bedeutung des Systems in der Progression von Nierenerkrankungen zu. In vielen Tiermodellen führt die Gabe von ACE-Hemmern zu einer Verlangsamung der Progression von renaler Sklerose<sup>113</sup>, ähnliche Effekte zeigte die Applikation von AT<sub>1</sub>-Rezeptor-Antagonisten<sup>114</sup>. Auch beim Menschen ließ sich dieser Effekt reproduzieren, so konnten die Dialysehäufigkeit von Typ-I-Diabetikern bei Behandlung mit ACE-Hemmern signifikant gesenkt werden, obwohl die Blutdruckunterschiede zwischen den verschiedenen Gruppen sehr gering waren, so daß dieser Einfluß nicht zur Erklärung des Befundes herangezogen werden konnte<sup>13,14,15</sup>.

Angiotensin II ist also ein weiteres Schlüsselmolekül für glomeruläre Fibrogenese, durch die Koppelung von mesangialer bNOS- und Renin-Expression könnte so auch die bNOS eine wichtige Rolle in der Matrixproliferation und der Entwicklung von Glomerulosklerose spielen.

In unserer Studie läßt sich zum Zeitpunkt 1M bei der Gruppe von Tieren, die eine protein- und argininarme Diät erhielten, eine von der bNOS-Expression unabhängige Heraufregulation der Renin-mRNA-Expression zeigen. Scheinbar führt eine Verminderung der Eiweißzufuhr über andere Mechanismen hier zu einer

Heraufregulation der Renin-Expression, die Ergebnisse der Studien, die entsprechende Zusammenhänge untersucht haben, sind in dieser Frage nicht eindeutig:

So zeigten Martinez-Maldonado et al. übereinstimmend mit unseren Ergebnissen, daß die Gabe proteinreduzierter Diäten bei gesunden Ratten einen Anstieg der mRNA-Expression für Renin und ACE gegenüber einer Diät mit normalem Proteingehalt bewirkte, während die Expression von mRNA für Angiotensinogen unbeeinflusst blieb<sup>115</sup>. Andere Untersucher wiederum konnten keinen Einfluß von zwei Vergleichsdiäten mit niedrigem bzw. hohem Proteingehalt auf die Plasma-Renin-Aktivität bei gesunden Hunden nachweisen, wobei hier keine Messung der Renin-mRNA-Expression stattfand<sup>116</sup>. Andere Arbeitsgruppen beobachteten allerdings auch den zu unseren Ergebnissen gegenteiligen Effekt: Die Gabe von proteinreduzierten Diäten führte bei gesunden Ratten zu einer Suppression der Plasma-Renin-Aktivität und der Serumspiegel von Angiotensin II und Aldosteron im Vergleich zu Diäten mit normalem Proteingehalt, allerdings liegen auch hier keine Daten über die Renin-mRNA-Expression bei diesen Tieren vor<sup>117</sup>. Die gleichen Untersucher fanden bei Gabe von proteinreduzierter Diät eine Heraufregulation der Expression von AT<sub>1</sub>-Rezeptoren, die sie für die entsprechenden Effekte verantwortlich machten<sup>118</sup>.

Unsere Ergebnisse zeigen einen reziproken Zusammenhang zwischen reduzierter Proteinzufuhr und Renin-mRNA-Expression. Warum dieser Effekt nach einem längeren Krankheitsverlauf über 2 Monate und mehr, nachdem die entzündlichen Vorgänge fast abgeklungen waren, scheinbar nicht mehr zum Tragen kam, ist unklar. Darüber, ob die ausklingende renale Entzündung an sich eine Vorbedingung für die erhöhte Renin-Expression ist, kann hier nur spekuliert werden. Auch die Frage, über welche Mechanismen eine reduzierte Proteinzufuhr einen wie auch immer gearteten Einfluß auf die Renin-Expression und seine Serum-Aktivität sowie dadurch gefolgte Veränderungen der Aktivität des Renin-Angiotensin-Systems ausüben vermag, ist auch von anderen Untersuchern bisher unzureichend erklärt und bedarf weiterer Untersuchung.

### **4.2.3 L-Arginin-Stoffwechsel via Arginase/ODC:**

Wie bereits im Einleitungsteil angedeutet, spielt auch der durch das Enzym Arginase katalysierte Weg im L-Arginin-Stoffwechsel möglicherweise eine bedeutende Rolle im Rahmen von entzündlichen Vorgängen. Über dieses Enzym werden aus L-Arginin Harnstoff und Ornithin hergestellt, letzteres dient als Vorstufe für die Synthese von Polyaminen via Ornithindecaboxylase (ODC) und von L-Prolin via Ornithinaminotransferase (OAT).

Es sind mindestens zwei distinkte Isoformen dieses Enzyms zu unterscheiden: Die eine (A I) findet sich in hohen Konzentrationen im Zytosol von Leberzellen und fungiert dort als Schlüsselenzym im Harnstoffzyklus, die andere (A II) ist mitochondrial lokalisiert und findet sich in extrahepatischen Geweben wie in Erythrozyten, laktierender Mamma und der Niere, hier ist sie v.a. im Bereich des äußeren Nierenmarks in den proximalen gestreckten Tubuli nachzuweisen. Beide Isoformen werden außerdem konstitutiv in Makrophagen exprimiert, allerdings kann ihre Aktivität durch verschiedene Stimuli beeinflusst werden<sup>119,120,121</sup>.

Die Interaktion zwischen den Arginasen und der iNOS vor allem in entzündlichen Vorgängen ist in den letzten Jahren Gegenstand vieler Untersuchungen gewesen, so könnten die Arginasen durch Konkurrenz um das Substrat L-Arginin, aber auch durch verschiedenartige Expression der beiden Enzymgruppen durch verschiedene Stimuli eine wichtige Bedeutung für die Regulation der Aktivität der NO-Synthasen haben. So ist beispielsweise LPS eine Substanz, die in der Lage ist, sowohl die Expression der Arginasen sowie die der iNOS parallel zu stimulieren. Verschiedene Zytokine stimulieren eher eines der beiden Enzymsysteme, so ist vor allem das durch T<sub>H1</sub>-Zellen produzierte IFN- $\gamma$  in der Lage, iNOS in Makrophagen zu induzieren, während andere, vornehmlich durch T<sub>H2</sub>-Zellen produzierte Zytokine wie IL-4, IL-10 und IL-13 potente Induktoren von Arginasen in diesen Zellen sind<sup>122</sup>. Werden Makrophagen in vitro mit NOS-Induktoren versetzt, ist ihre Reaktion auf Arginase-Induktoren herabgesetzt, versetzt man die Zellen mit Arginase-Induktoren, findet sich eine entsprechend herabgesetzte Reaktion auf NOS-Induktion<sup>120</sup>. Aus der Wundheilungsforschung ist zudem bekannt, daß es im Wundgebiet zu einer Arginaseaktivierung kommt, welche in der Lage ist, zu einer L-Arginin-Verarmung im Wundgebiet zu führen<sup>53,54</sup>. Die beiden Enzymsysteme scheinen demnach komplex

zu interagieren und könnten möglicherweise im Rahmen von entzündlichen Vorgängen eine modulierende Wirkung auf die Immunreaktion ausüben.

Auch der folgende Stoffwechselschritt via ODC, der zur Bildung von Polyaminen führt, könnte im Zusammenhang mit entzündlichen Vorgängen und Fibrogenese bedeutsam sein: Polyamine (Spermin, Spermidin, Putrescin) sind kleine, kationische Moleküle, die essentiell wichtig sind für die Regulation von Zellwachstum und -reparatur. Ihre Bildung wird z.B. durch Androgene und Steroide reguliert<sup>123</sup>. Polyamine induzieren DNA- und RNA-Synthese über bisher unzureichend verstandene Mechanismen, so werden sowohl nicht-kovalente Interaktionen mit Makromolekülen als auch die Stimulation von Nicht-Rezeptor-Tyrosinkinasen diskutiert<sup>56,124</sup>. Allgemein spielen Polyamine in der Pathophysiologie von verschiedenen chronischen Nierenerkrankungen und entzündlichen Vorgängen eine bedeutende Rolle<sup>76,125,126,127,128</sup>.

Desweiteren scheint in diesem Zusammenhang interessant, daß die bei der durch die ODC katalysierten Reaktion entstehenden Produkte die Expression des Wachstumsfaktors TGF- $\beta_1$ , der, wie unter 1.2.2 erwähnt, eine wesentliche Rolle beim Sklerosierungsprozeß im Glomerulum zu spielen scheint, induziert werden kann. So konnte durch gezielte In-vitro-Inhibition der ODC mittels Difluoromethyl-Ornithin (DFMO) die TGF- $\beta_1$ -induzierte Hypertrophie und Fibronectin-Synthese von Mesangialzellen effektiv gehemmt werden<sup>129,130</sup>. Auch auf diesem Weg könnten damit Mediatoren für die Fibrosierung zur Verfügung gestellt werden<sup>24</sup>.

L-Prolin als Produkt der durch die OAT katalysierten Reaktion wiederum ist ein wichtiger Bestandteil von Kollagenmolekülen. So macht die hydroxylierte Aminosäure etwa 12% der Gesamtkollagenmasse aus. Bei fibrosierenden Prozessen könnte demnach die Regulation der Bereitstellung von L-Prolin einen quantitativen und qualitativen Unterschied in der Sklerosierung von entzündeten Geweben bewirken.

Demnach könnte im Rahmen des Arginin-Stoffwechsels zusätzlich zu dem inflammatorischen Prinzip durch NO-Synthese auch ein fibrosierendes Prinzip durch Bereitstellung von Matrix-Komponenten existieren.

In zahlreichen Arbeiten konnte gezeigt werden, daß während akuter renaler Entzündungsvorgänge die Aktivität der Arginase deutlich erhöht ist: dies ließ sich sowohl für die aThy1-GN<sup>51</sup> während der ersten 5 Tage als auch für die nephrotoxische<sup>75</sup> und die In-Situ-Immunkomplex-Nephritis (gemessen bis 7 Tage)<sup>41</sup>

nachweisen.

Bei der akuten aThy-1-GN ließ sich außerdem zeigen, daß die Expression und Aktivität der ODC 6 Stunden und 3 Tage nach Krankheitsinduktion deutlich erhöht waren und daß es im gleichen Zeitraum zu einer Stimulation der OAT kam<sup>51</sup>.

Die Beobachtung, daß die Behandlung von nephritischen Ratten mit Arginin-reduzierten Diäten eine deutliche Reduktion von Matrixexpansion und Fibrosierung der Glomeruli zur Folge hatte<sup>24</sup>, könnte auch über diese Stoffwechselwege erklärt werden, davon ausgehend, daß der Entzug von Arginin zu einer Verarmung an Polyaminen und Prolin im entzündeten Gewebe führte.

In unserer Studie ließ sich ein Einfluß auf die Arginase-Aktivität durch die diätetische Modifikation der Arginin-Zufuhr zeigen, die Reduktion der Argininzufuhr reduzierte auch die Aktivität des Enzyms, eine Supplementation mit Arginin erhöhte sie. Außerdem hatte aber auch der Gesamtgehalt an Protein einen Einfluß: In den Gruppen mit reduziertem Proteingehalt war die Arginase-Aktivität noch zusätzlich reduziert.

In den Tieren, bei denen die aThy1-GN nicht induziert worden war, zeigte sich allerdings eine höhere mittlere Arginase-Aktivität als bei den erkrankten.

Eine Einflußnahme auf die ODC-Expression durch eine Modifikation der Arginin-Zufuhr ließ sich in unserer Arbeit nicht nachweisen. Zumindest zu den in dieser Arbeit untersuchten späten Zeitpunkten des Krankheitsverlaufes ist die Aktivität der ODC demnach von dem Substratangebot unabhängig und durch dessen Alteration nicht beeinflussbar. Mittlerweile konnte zudem gezeigt werden, daß die selektive ODC-Hemmung bei akuter aThy1-Glomerulonephritis *in vivo* keinen signifikanten Effekt auf den Krankheitsverlauf dieses Modells hatte<sup>77</sup>.

Die Beobachtung einer Herabregulation der Arginase während entzündlicher Vorgänge widerspricht den Ergebnissen der oben genannten Arbeiten. Auch eine Bedeutung der Arginase im Sinne einer erhöhten Bereitstellung von Matrixkomponenten und damit einer Begünstigung von Fibrosierung ließe sich durch diese Beobachtung kaum erklären.

Im Unterschied zu den zitierten Studien, die sämtlich die Vorgänge bei akuten Entzündungen untersuchten, handelte es sich bei unserem Tiermodell allerdings um eine chronische Entzündung, d.h. defekte und irreguläre Wundheilung. Hier scheint die Aktivität der Arginase durch die Krankheit im Vergleich zu gesunden Tieren eher



herabreguliert zu werden. Denkbar wäre, daß die Herabregulation der Arginase ein Beispiel für einen solchen fehlregulierten Vorgang im Rahmen der chronischen Entzündung ist. Die Bereitstellung von Matrixkomponenten als „Rohstoff“ für Defektheilung und von Polyaminen als Regulatoren der Heilungsvorgänge würde demnach unzureichend funktionieren und u.U. eine „normale“ Wundheilung erschweren.

Ob sich diese Beobachtungen im Rahmen weiterer Studien im Rahmen unseres Tiermodells bestätigen lassen, muß abgewartet werden. Die These, daß die Arginase im Rahmen einer akuten Entzündung anders reagiert als in einer chronischen, bedarf sicherlich weiterer Untersuchungen.

#### **4.2.4 Serum-Aminosäuren und „low-protein“-Diät:**

Die in diesem Teil der Studie erzeugten Daten über den Verlauf der Serumspiegel der im L-Arginin-Stoffwechsel bedeutsamen Aminosäuren bei chronischer aThy1- Glomerulonephritis decken sich weitgehend mit denen unserer parallelen Präventionsstudie: In beiden Versuchen zeigte sich nach einmonatigem Krankheitsverlauf, daß die Serumspiegel der Aminosäuren jeweils gegenüber den Gruppen, die Diäten mit gleichem Arginin- aber höherem Proteingehalt erhalten hatten, signifikant erhöht waren, bei Verringerung der Gesamtproteinzufuhr also signifikant höhere Serumspiegel zu finden waren. Nach 4 Monaten waren diese Unterschiede nicht mehr zu beobachten, auch die gesunden Kontrolltiere zeigten keine signifikanten Abweichungen der Spiegel zwischen den einzelnen Diätgruppen<sup>131</sup>.

Das Phänomen, daß unter proteinreduzierter Diät die Serumspiegel der Aminosäuren heraufreguliert sind, findet sich nach unseren Daten demnach nur bei Tieren mit Glomerulonephritis in der frühen Phase nach 1 Monat, ist also an die Nierenerkrankung gebunden und außerdem im späten Krankheitsverlauf nicht mehr nachweisbar. Die Serumspiegel zeigen demnach eine Form von zunächst überschießender Gegenregulation in kranken Tieren, die nach längerem Krankheitsverlauf adaptiert, was möglicherweise durch eine Anpassung der endogenen Aminosäuresynthese hervorgerufen wird.

Es existieren nicht viele spezifische Daten anderer Arbeitsgruppen über die

Beeinflussung der Serumspiegel der von uns untersuchten Aminosäuren durch die Gabe von proteinreduzierten Diäten, die unsere Beobachtungen direkt stützen oder widerlegen könnten, es existieren aber einige indirekte Hinweise:

Bekannt ist seit längerem, daß in der Urämie die Serumspiegel und die intrazellulären Konzentrationen der Aminosäuren verändert sind. Das Gleichgewicht zwischen verschiedenen Aminosäuren ist gestört, der entscheidende Parameter für endogen induzierte Veränderungen ihrer Synthese ist dabei der Spiegel der jeweiligen Aminosäure im Intrazellularraum<sup>132</sup>. Dies stützt unsere Beobachtung, nach der Veränderungen der Aminosäurespiegel nur in den kranken, nicht aber in den Kontrolltieren zu beobachten waren.

Schon 1975 wurde, parallel zu unseren Ergebnissen, beobachtet, daß eine alimentäre Proteindepletion in Ratten zu erhöhten Serumspiegeln von verschiedenen Aminosäuren (Asp, Gly, Ala, His) führte, allerdings finden sich keine Angaben über die von uns untersuchten, im Rahmen des L-Arginin-Stoffwechsels relevanten, Aminosäuren<sup>133</sup>.

Auch von Hansen et al. ließ sich zeigen, daß sich der Metabolismus der Aminosäuren in Hunden mit chronischer Niereninsuffizienz im Vergleich zu gesunden Tieren verändert: so waren die Spiegel verschiedener Aminosäuren gegenüber der Kontrollgruppe mit gesunden Tieren erhöht (Serin) bzw. erniedrigt (Cystathionin, Phenylalanin und 3-Methylhistidin). Auch war hier eine Abhängigkeit der jeweiligen Serumspiegel von der verabreichten Diät zu beobachten: so führte die Gabe von proteinreduzierter Nahrung zu einer Erhöhung der Serumspiegel verschiedener Aminosäuren gegenüber einer Diät mit normalem Proteingehalt, unter anderem auch dem von Prolin, wie er sich in unserer Studie zeigte<sup>134</sup>.

Untersuchungen von Colombo et al. ergaben, daß die Gabe von proteinreduzierter Diät in Ratten zu erhöhten Serumspiegeln von einer ganzen Reihe von Aminosäuren (Ser, Glu, Gln, Gly, Ala, Met, Ile, Leu, Phe), unter ihnen, übereinstimmend mit unseren Ergebnissen, das auch von uns untersuchte Ornithin, führte, obwohl die zugeführte Nahrung einen verminderten Gehalt dieser Aminosäuren enthielt. Diese Diät führte außerdem zu einer Heraufregulation der Aktivität der in der Leber für den Metabolismus der Aminosäuren verantwortlichen Enzyme um das zwei- bis fünffache, so daß die veränderten Serumspiegel auf die Aktivität des endogenen Syntheseapparats zurückgeführt werden konnten<sup>135</sup>. Ein ähnliches Phänomen wurde

auch von Fujita et al. beobachtet: Die Fütterung von proteinreduzierten Diäten in Ratten führte zu einer erhöhten Aminosäureproduktion von perfundierten Leberzellen<sup>136</sup>. Diese Ergebnisse legen die Vermutung nahe, daß für die beschriebenen Veränderungen der Aminosäurespiegel vermutlich eine Adaptation der endogenen Synthese von Aminosäuren durch die Leber verantwortlich zu machen ist.

Dieser Vorstellung wiederum widersprechen Ergebnisse von Castillo et al., nach denen bei gesunden Männern unter argininfreier Diät im Vergleich zu Argininsupplementation keine Heraufregulation der endogenen Arginin-Synthese zu beobachten war<sup>137</sup>.

Zusammenfassend läßt sich also feststellen, daß eine Störung des Aminosäure-Metabolismus bei Urämie und eine Erhöhung der Serumspiegel verschiedener Aminosäuren auch von andere Arbeitsgruppen beobachtet wurden. Dies ist auch deshalb bemerkenswert, weil die weit überwiegende Mehrzahl von Studien, die den Einfluß einer diätetischen L-Arginindepletion bzw. -supplementation auf die Aktivität entzündlicher Erkrankungen und des NO-Systems untersucht haben, meistens selbstverständlich davon ausgingen, daß eine reduzierte bzw. erhöhte Zufuhr einer Aminosäure automatisch zu einem parallelen Verhalten des entsprechenden Serumspiegels führen müßte, ohne dies jedoch konkret nachzuprüfen. Sollten sich unsere Beobachtungen in anderen Studien bestätigen lassen, müßte dies die pathogenetischen Vorstellungen darüber, wie die schon häufig nachgewiesene Wirkung solcher Diäten zu erklären ist, verändern.

Speziell zu den von uns untersuchten Aminosäuren ist die Quellenlage jedoch unzureichend und unsere Ergebnisse sind vor dem Hintergrund eines floriden Glomerulonephritis-Modells zu betrachten und bedürfen weiterer Untersuchung. Auch über die Mechanismen der Adaptation von Serumspiegeln kann hier nur spekuliert werden.

### **4.3 Fazit:**

Der neue Aspekt unserer Untersuchung war, daß erstmalig die Effekte einer diätetischen L-Arginin-/Protein-Modulation an einem *chronischen* Modell der Glomerulonephritis untersucht wurden. Gleichzeitig wurden die Effekte bei Gabe der

Diäten während der hochakuten Entzündungsphase („Präventionsstudie“) mit denen der Gabe während der chronischen Fibrosephase („Regressionsstudie“) verglichen, wobei in dieser Arbeit die Resultate der Regressionsstudie dargelegt wurden.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß bei etablierter Fibrose

- kein Effekt der Diäten auf das Ausmaß des histologischen Schadens, der Albuminurie und der NO-Synthese zu beobachten waren,
- auch die glomeruläre bNOS-mRNA-Expression durch die Diäten unbeeinflusst blieb
- die Gabe L-Arginin- und proteinreduzierter Diät eine erhöhte Expression von Renin-mRNA nach 1 Monat Krankheitsverlauf zur Folge hatte, dies aber in keinem Zusammenhang zur glomerulären bNOS-Expression stand und der einzige zu beobachtende Effekt der Diät auf die Renin-mRNA-Expression war,
- die Arginase-Aktivität, wie erwartet, abhängig vom und parallel zum Substratangebot reguliert wurde, dies aber keinen Einfluß auf den histologischen oder funktionellen Zustand der Niere hatte,
- die Aktivität der Ornithindecaboxylase (ODC) offenbar keine pathophysiologische Relevanz im Krankheitsgeschehen hatte und durch die Diäten unbeeinflusst blieb und
- eine überschießende Erhöhung der Aminosäurespiegel im Serum bei der Gabe von proteinreduzierter Kost zu beobachten war, die aber nach chronischer diätetischer Modulation der Aminosäure-Zufuhr offenbar wirksam adaptiert werden konnte.

Diese Ergebnisse stehen im Gegensatz zu den bisher unveröffentlichten Daten der Präventionsstudie, bei der es in der Gruppe mit L-Arginin-Supplementation zu einer deutlichen Steigerung des histologischen Schadens, der Albuminurie und der glomerulären NO-Produktion kam und eine erhöhte glomeruläre Expression von iNOS-mRNA im Vergleich mit den anderen Diätgruppen beobachtet werden konnte. Gleichzeitig erreichten die entsprechenden Parameter in der Gruppe mit L-Arginin- und Protein-Reduktion die niedrigsten Werte aller Vergleichsgruppen<sup>138</sup>. Hier war also eine erhöhte Aktivität des NO-Systems sowie eine erhöhte entzündliche Krankheitsaktivität durch L-Arginin-Supplementation induzierbar, während die

Restriktion der Aminosäure zu einer Verminderung der enzymatischen und entzündlichen Aktivität führten.

Die entscheidende Phase für die therapeutische Beeinflussung einer renalen Entzündung in Hinblick auf ihre Pathophysiologie und ihren Langzeitverlauf scheint nach unseren Ergebnissen demnach allein die Phase der akuten Entzündung zu sein. Die in dieser Phase in Gang gesetzten Mechanismen scheinen, einmal initiiert, das spätere Geschehen in der Niere und das Ausmaß ihres terminalen Schadens zu bestimmen und irreversibel zu sein, das heißt, eine Regression der Fibrose durch Intervention mit dem L-Arginin-/NO-System ist nicht mehr möglich, wenn ein Schaden jenseits der Reparaturmöglichkeiten des Organismus gesetzt ist (*„injury beyond repair“*).

Der Versuch, eine einmal initiierte Entzündung und Sklerosierung der Niere im späten, chronischen Verlauf der Erkrankung therapeutisch zu beeinflussen, wie es modellhaft in dieser Studie untersucht wurde, scheint nach unseren Ergebnissen wenig erfolgversprechend, es gibt also scheinbar einen *„point of no return“*, dessen Verstreichen die Möglichkeit einer Einflußnahme auf den Krankheitsverlauf entscheidend schmälert.