

Aus dem Institut für Klinische Pharmakologie  
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Wirkung einer Vasopeptidasehemmung auf  
kardiale und renale Endorganschäden im  
5/6-Nephrektomiemodell der Ratte

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Katharina Schröder

aus Mainz

Gutachter: 1. Priv.-Doz. Dr. med. L. Rothermund  
2. Prof. Dr. med. H. Peters  
3. Priv.-Doz. Dr. med. J. Beige

**Datum der Promotion: 18.09.2009**

# Inhaltsverzeichnis

<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS .....</b>	<b>5</b>
<b>1. EINLEITUNG .....</b>	<b>8</b>
1.1. Epidemiologie und Ätiologie der arteriellen Hypertonie.....	8
1.2. Schädigungsmuster der arteriellen Hypertonie .....	11
1.2.1. Hypertensive Nephropathie.....	11
1.2.2. Linksherzhypertrophie und Herzinsuffizienz.....	14
1.2.3. Hypertensive Vaskulopathie .....	17
1.3. Hemmung des RAS.....	19
1.4. Hemmung der Vasopeptidase .....	21
1.5. Zielstellung dieser Arbeit .....	23
<b>2. MATERIAL UND METHODEN.....</b>	<b>23</b>
2.1. Material .....	23
2.1.1. Lösungen.....	23
2.1.2. Chemikalien und Medikamente .....	24
2.1.3. Instrumente und Nahtmaterial.....	26
2.1.4. Geräte.....	26
2.1.5. Sonstige Materialien und Futtermittel.....	27
2.2. Methoden.....	28
2.2.1. Tierexperimentelle Untersuchungen .....	28
2.2.1.1. Tierstamm und Haltung.....	28
2.2.1.2. OP-Technik .....	29
2.2.1.3. OP-Vorbereitung .....	29
2.2.1.4. Technik der 5/6-Nephrektomie .....	29
2.2.1.5. Gruppeneinteilung und Studiendesign .....	31
2.2.2. Blutdruckmessung.....	32
2.2.3. Bestimmung von Kreatininclearance und Albuminurie .....	33
2.2.3.1. Gewinnung des 24h-Urin .....	33
2.2.3.2. Bestimmung der Cratininclearance .....	33
2.2.3.3. Albuminbestimmung .....	33
2.2.4. Tötung der Versuchstiere und Organentnahme.....	35
2.2.5. Histologie.....	36
2.2.5.1. Paraffineinbettung der Organe .....	36
2.2.5.2. Schneiden und Färben der Organe .....	36
2.2.6. Semiquantitative Bewertung und morphometrische Bildanalyse.....	37
2.2.6.1. Semiquantitative Bewertung der Glomerulosklerose in der Niere .....	37
2.2.6.2. Morphometrische Bildanalyse der interstitiellen und der perivaskulären Fibrose des Herzens .....	39
2.2.7. Statistische Analyse .....	40
<b>3. ERGEBNISSE .....</b>	<b>41</b>
3.1. Blutdruck.....	41
3.2. Kreatininclearance .....	42

3.3.	Albuminurie .....	43
3.4.	Glomerulosklerose .....	44
3.5.	Linksventrikuläres Gewicht/Körpergewicht.....	45
3.6.	Interstitielle Fibrose.....	46
3.7.	Perivaskuläre Fibrose.....	46
<b>4.</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>48</b>
4.1.	Blutdruck.....	49
4.2.	Nierenfunktionseinschränkung .....	52
4.2.1.	Kreatininclearance .....	52
4.2.2.	Albuminurie .....	54
4.3.	Glomerulosklerose .....	57
4.4.	Linksherzhypertrophie.....	59
4.5.	Herzfibrosierung.....	62
<b>5.</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>64</b>
	<b>LEBENS LAUF.....</b>	<b>65</b>
	<b>ERKLÄRUNG .....</b>	<b>66</b>
	<b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>67</b>

## Abkürzungsverzeichnis

A. renalis	Arteria renalis
ACE	Angiotensin-converting-enzyme (engl.)
ACTH	Adreno-Corticotropes Hormon
Ang II	Angiotensin II
ANP	Atriales natriuretisches Peptid
Aogen	Angiotensinogen
AT	Angiotensin
AVE	Vasopeptidase Inhibitor
BNP	„B-Typ“ Natriuretisches Peptid („brain“)
BW	body weight (engl.)
CHF	Herzinsuffizienz (chronical heart failure)
CCL	Kreatinin-Clearance
cNI	chronische Niereninsuffizienz
CNP	„C-Typ“-Natriuretisches Peptid
ECE	Endothelin-Conversions Enzym
ECM	extrazelluläre Matrix
EKG	Elektrokardiogramm
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
ENP	Enalapril
ET	Endothelin
FEM	Forschungsinstitut für experimentelle Medizin
FU	Freie Universität
GFR	Glomeruläre Filtrationsrate
GSI	Glomerulosklerose Index
HW	Herzgewicht
HOPE	Heart Outcomes Prevention Evaluation (engl.)
JNC-7	Joint National Committee on the Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure
KG	Körpergewicht
Ko Sham	scheinoperierte Kontrollgruppe
LIFE	Losartan Intervention for Endpoint reduction in hypertension study

LV	linker Ventrikel
LVH	Linksventrikuläre Hypertrophie
NI	Niereninsuffizienz
NP	Natriuretisches Peptid
NEP	Neutrale Endopeptidase
NSAR	Nichtsteroidale Antirheumatika
Nx	(5/6-)Nephrektomie
OMA	Omapatrilat
OP	Operation
p	p-Wert für Signifikanz
PAS	„Periodic Acid Schiff“
PAVK	Periphere arterielle Verschlusskrankheit
RAAS/RAS	Renin - Angiotensin – (Aldosteron -) System
RV	rechter Ventrikel
SBD	systolischer Blutdruck
SEM	Standardfehler des Mittelwertes
SHR	Spontan hypertensive Ratte
SNGFR	single nephron glomerular filtraion rate (engl.)
SPSHR	Stroke-prone spontaneous hypertensive Ratte
tNV	terminales Nierenversagen
TSE Bad Homburg	Technical & Scientific Equipment GmbH Bad Homburg
UKBF	Universitätsklinikum Benjamin Franklin
WHO	World Health Organisation (engl.)
WKY	Wistar-Kyoto Ratten
ZNS	Zentrales Nervensystem
Ztm	Zentrales Tierlaboratorium Medizinische Hochschule Hannover

Synonyme:

KG= Körpergewicht = bodyweight = BW

Subtotale Nephrektomie = STNx = renale Ablation = 5/6-Nephrektomie = Nx

verwendete Einheiten und chemisch-/physikalische Abkürzungen:

°C                      Grad Celsius

cm                      Zentimeter

l	Liter
mg/d	Milligramm pro Tag
mg/dl	Milligramm pro Deziliter
mg/g	Milligramm pro Gramm
mg/kg, mg/g KG	Milligramm pro Kilogramm bzw. Gramm Körpergewicht
mg/ml	Milligramm pro Milliliter
ml	Milliliter
ml/min	Milliliter pro Minute
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
μl	Mikroliter
μmol/l	Mikromol pro Liter
μm <sup>2</sup>	Quadratmikrometer
nm	Nanometer
pH	potentia hydrogenii (lat.)
U/min	Umdrehungen pro Minute
%	Prozent

# 1. Einleitung

Kardiovaskuläre Erkrankungen wie Koronare Herzerkrankung, zerebrovaskuläre Erkrankungen, Hypertonie, PAVK etc. sind laut Weltgesundheitsorganisation (WHO) ursächlich für ein Drittel der weltweiten Todesfälle. Die arterielle Hypertonie ist dabei ein weit verbreiteter Risikofaktor für weitere kardiovaskuläre Erkrankungen in der industrialisierten Welt. Weltweit wird die Hypertonie als Ursache von 7,1 Millionen verfrühten Sterbefällen eingeschätzt<sup>1</sup>. Global können 62% der zerebrovaskulären Erkrankungen und 49% der ischämischen Herzerkrankungen einer suboptimalen Blutdruckeinstellung zugeschrieben werden<sup>2</sup>.

Klinische Bedeutung kommt der arteriellen Hypertonie durch die Manifestation von Endorganschäden zu. Dabei wirken durch den erhöhten Blutdruck verursachte allgemeine Pathomechanismen, zum Beispiel am Gefäßsystem, mit organspezifischen Schädigungsprozessen an den Zielorganen zusammen.

Die direkten wie indirekten Folgen der arteriellen Hypertonie betreffen Herz, Nieren und Gefäßsystem. Hierbei ist interessant, dass zum Teil gleiche Signalkaskaden zu den kardialen, renalen und vaskulären hypertensiven Endorganschäden beitragen.

Dabei können die durch die arterielle Hypertonie hervorgerufenen Endorganschäden über einen *circulus vitiosus* zur Perpetuierung des Bluthochdrucks beitragen. Die strukturellen Umbauprozesse in Nieren und Gefäßen sowie eine Änderung des Sollwertes des Barorezeptorreflexes sind wichtige Pathomechanismen für Aufrechterhaltung und Verstärkung der arteriellen Hypertonie<sup>3</sup>. Im Rahmen der hypertensiven Nephropathie entwickelt sich durch einen fortschreitenden Untergang von Nephronen eine kompensatorische Hyperfiltration und glomeruläre Hypertonie in den verbleibenden Glomeruli<sup>4</sup>. Folge sind die sich verstärkende Glomerulosklerose und eine Zunahme der systemischen arteriellen Hypertonie. Eine länger bestehende Hypertonie führt in den arteriellen Gefäßen zu proliferativen und sklerotischen Veränderungen. Daraus resultieren eine Verminderung der Compliance der Leitungsarterien und eine Zunahme der Resistance in den Widerstandsgefäßen.

## ***1.1. Epidemiologie und Ätiologie der arteriellen Hypertonie***

Weltweit sind ca. 15%–37% der erwachsenen Bevölkerung von einer Hypertonie betroffen, im Alter über 60 Jahren in einigen Gesellschaften bis zu 50%<sup>5</sup>.

Wegen des konstanten Anstiegs des kardiovaskulären Risikos gibt es keinen Schwellenwert, von dem aus der arterielle Blutdruck als „pathologisch erhöht“ von der Normotonie unterschieden werden kann. Die WHO definiert den Grenzwert deshalb willkürlich bei einem Wert, bei dem das Risiko von Schädigungen der kardiovaskulären Endorgane signifikant zu steigen beginnt. Aktuell ist diese Grenze systolisch bei 140 mmHg und diastolisch bei 90 mmHg fixiert<sup>1</sup>. Bei diesem Blutdruck ist gegenüber niedrigeren Werten die Mortalität durch kardiovaskuläre Erkrankungen um 50% gesteigert. Bei einem systolischen Blutdruck über 140 mmHg und einem diastolischen Blutdruck über 90 mmHg liegt somit eine arterielle Hypertonie vor und somit nach allgemeiner Übereinkunft eine Indikation zur Behandlung.

Eine Diagnose der Ursache des arteriellen Blutdruckes ist bei bis zu 95% der Hypertoniker nicht möglich<sup>6</sup>. Dies wird als „essentielle“ oder primäre Hypertonie bezeichnet. Im Gegensatz dazu ist bei der sekundären Hypertonie eine Ursache in Form von endokrinen, renalen oder vaskulären Erkrankungen nachweisbar und sie ist potentiell kurabel.

Trotz zahlreicher Hypothesen ist die genaue Pathogenese der primären Hypertonie nach wie vor nicht bekannt. Das Spektrum der möglichen Pathomechanismen umfasst sowohl extrarenale Faktoren wie Mangel zirkulierender Vasodepressoren<sup>7</sup>, zirkulierende Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase-Hemmstoffe<sup>8</sup> und Überaktivität des sympathischen Nervensystems<sup>6</sup> als auch renale Ursachen wie minimale intrarenale Schädigungen<sup>9</sup>, intrarenale Ischämie<sup>10</sup>, heterogene Aktivierung des Renin-Angiotensin Systems (RAS)<sup>11</sup>, verminderte Drucknatriurese<sup>12</sup>, einen genetischen Defekt der Natriumexkretion<sup>13</sup>, gesteigerte glomerulotubuläre Balance<sup>14</sup> und eine genetisch oder erworben verminderte Anzahl von Nephronen<sup>15,16</sup>.

Bestimmte Funktionsstörungen der Niere gemeinsam mit strukturellen Veränderungen der Niere sind laut diverser Befunde notwendige Voraussetzung für die Manifestation einer Hypertonie<sup>17,18</sup> und der hypertensiven Endorganschäden.

Seit langem ist die zentrale Rolle der Niere bei der Blutdruckregulation bekannt. Initial liegen bei der primären Hypertonie die Nierenperfusion und die glomeruläre Filtrationsrate im Normbereich. Dennoch ist die Einschränkung der Nierenfunktion schon zu diesem Zeitpunkt messbar. Unklarheit herrscht darüber, ob diese Funktionseinschränkungen Auslöser oder Folge der Hypertonie sind. Diese renalen Funktionsänderungen der Hypertoniker tragen definitiv zur Progression der hypertensiven Nephropathie und der kardiovaskulären Endorganschäden bei<sup>19</sup>.

Guyton's Modell des *renal body fluid-pressure control system*<sup>12</sup> beschreibt die Nieren als zentralen Regulator des Langzeitblutdrucks. Nach diesem Modell führen pathologische Funktionseinschränkungen der Niere zu einer jeweils charakteristischen *renal function curve* (Abbildung 1), in der nur ein bestimmter arterieller Blutdruck abhängig von der Natrium- und

Wassereinnahme eine ausgeglichene Natrium- und Wasserbilanz ermöglicht<sup>12</sup>.

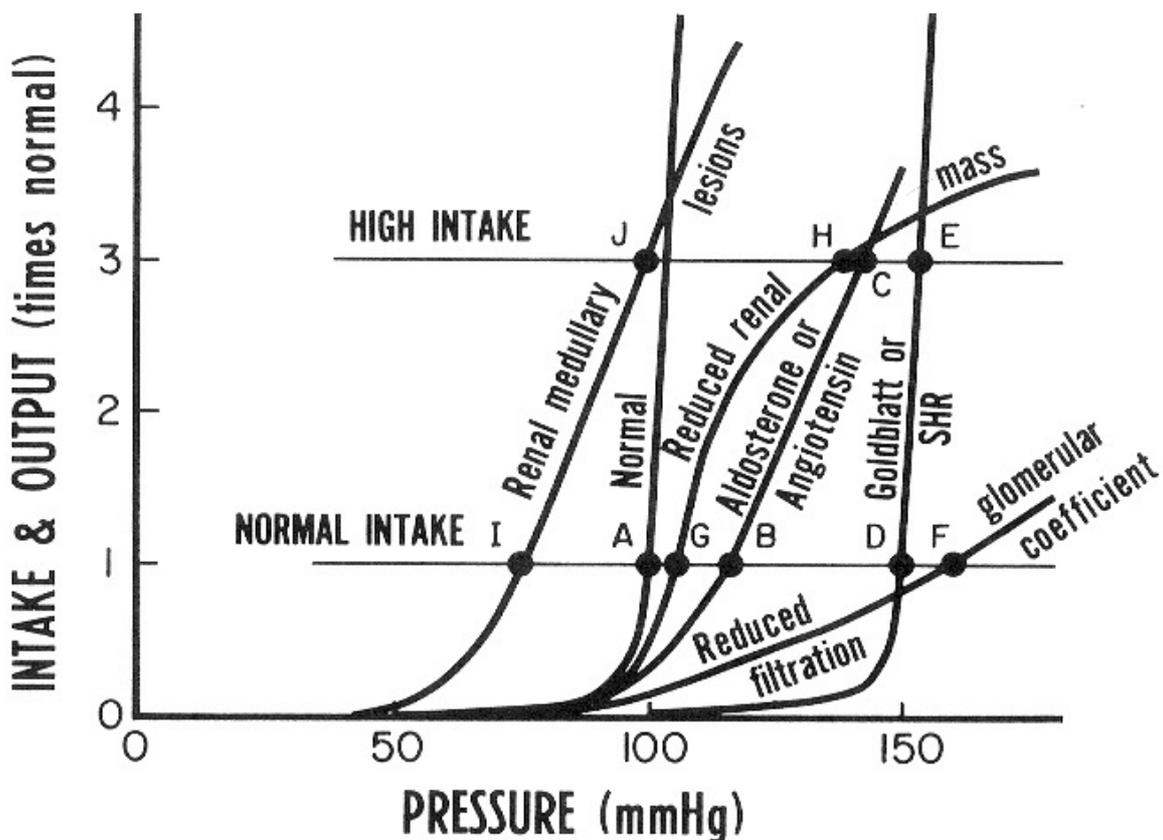


Abbildung 1: Druck-Natriurese-Beziehung zur langfristigen Blutdruckregulation. An der Ordinate ist die Höhe des Natrium/Wasser-Durchsatzes (Einfuhr = Ausfuhr), an der Abszisse der mittlere arterielle Blutdruck dargestellt. Jeder pathologischen Funktionseinschränkung der Niere ist eine charakteristische renal function curve zugeordnet (nach Guyton<sup>20</sup>).

Aus diesem Konzept lässt sich ableiten, dass sich eine Hypertonie nur dann entwickeln kann, wenn ein Störfaktor die Ausscheidungsfähigkeit der Niere für Salz und Wasser beeinträchtigt. Das Erreichen einer ausgeglichenen Salz-Wasserbilanz wird somit erst bei erhöhten Blutdruckwerten möglich und die *renal function curve* daher nach rechts zu höheren Blutdruckwerten hin verschoben. Die Guyton-Hypothese setzt aber nicht voraus, dass die arterielle Hypertonie ihren Ursprungsmechanismus in der Niere selbst hat. Unabhängig von der Ursache für den Bluthochdruck und die renale Funktionsstörung ist jedoch zum Erreichen einer ausgeglichenen Salz-Wasserbilanz bei unveränderter Zufuhr ein erhöhtes Druckniveau notwendig.

Unklar bleibt bisher, ob ein erhöhter interstitieller hydrostatischer Druck im Nierenmark und/oder ein Anstieg des Perfusionsdruckes in den *vasa recta* ausreicht, um eine Drucknatriurese unter verschiedenen pathophysiologischen Bedingungen zu erklären. Dies gilt insbesondere, da die myogene Reagibilität des *vas afferens* (und damit ein zentraler Anteil der renalen Autoregulation) bekanntlich bei chronischer Nierenerkrankung häufig aufgrund der bestehenden Arteriosklerose nicht mehr effektiv möglich ist.

Durch Transplantationsversuche konnte eindrücklich die entscheidende Rolle der Nieren bei der Pathogenese der arteriellen Hypertonie und der hypertensiven Endorganschäden aufgezeigt werden. Überkreuztransplantation von Nieren zwischen normotonen und hypertensiven Rattenstämmen haben die Abhängigkeit der arteriellen Hypertonie von der Spenderniere und nicht vom Empfängerorganismus belegt<sup>21</sup>. Vergleichbare Befunde wurden auch an nierentransplantierten Patienten festgestellt<sup>22</sup>.

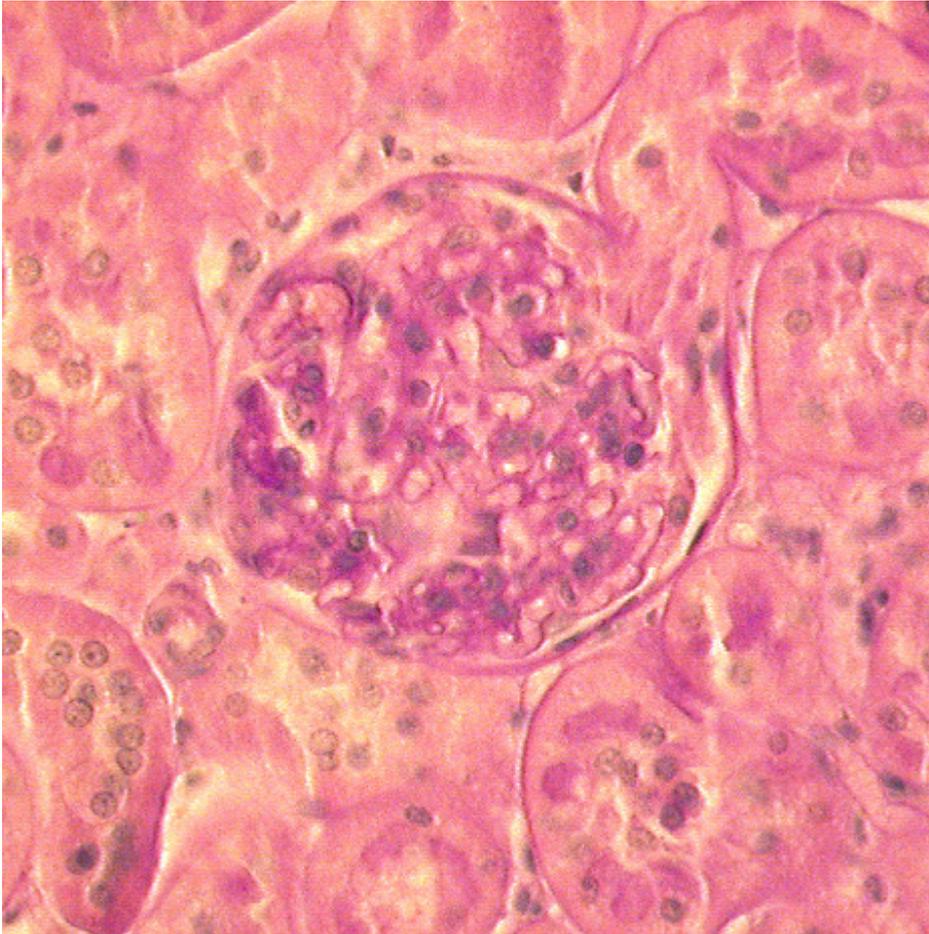
## ***1.2. Schädigungsmuster der arteriellen Hypertonie***

Die Mehrzahl aller Hypertoniker entwickelt eine frühzeitige Arteriosklerose, die dann zu zahlreichen Endorganschädigungen beitragen kann.

### **1.2.1. Hypertensive Nephropathie**

Mit einem Anteil von 15% ist die hypertensive Nierenerkrankung eine der häufigsten Ursachen eines terminalen Nierenversagens (tNV) in Europa<sup>23</sup> und den USA<sup>24</sup>. Klinisch kennzeichnet die hypertensive Nephropathie eine arterielle Hypertonie, ein Abfall der glomerulären Filtrationsrate (GFR) und eine zunehmende Proteinurie<sup>25</sup>.

Die Nierenbiopsie ist der „Goldstandard“ der Diagnose einer „benignen“ hypertensiven Nephrosklerose. Pathomorphologisch imponiert eine hyaline Degeneration der Arteriolen, am Glomerulus ein Kollaps der Kapillarschlingen und eine Glomerulosklerose, im Niereninterstitium eine interstitielle Fibrose sowie eine ausgeprägte Tubulusatrophie<sup>26</sup> (vgl. Abbildung 2).



**Abbildung 2: Histologischer Nierenschnitt in PAS-Färbung.**

Die Diagnose der hypertensiven Nephrosklerose ist jedoch in der Regel eine Ausschlussdiagnose aufgrund der charakteristischen klinischen Präsentation<sup>27</sup>. Die Spezifität dieser Ausschlussdiagnose liegt ohne Biopsie zwischen 50% und 90%<sup>28,29</sup>. Die Häufigkeit eines tNV nimmt in Kombination mit anderen Risikofaktoren wie hohem Lebensalter, Diabetes mellitus, Nikotinabusus, ethnischer Zugehörigkeit und Mikroalbuminurie zu<sup>30,31,32</sup>.

Die Folgen einer hypertensiven Nephropathie bestehen hauptsächlich in einer Zunahme der Proteinausscheidung, einem beschleunigten Nierenfunktionsverlust, einem erhöhten kardiovaskulären Risiko (vor allem aufgrund einer linksventrikulären Hypertrophie) und schließlich einer gesteigerten kardiovaskulären Mortalität. Das *Joint National Committee on the Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure* (JNC-7) der USA empfiehlt bei Patienten mit bereits bestehender chronischer Nierenerkrankung in seinen aktuellen Richtlinien eine aggressive Senkung des Blutdruckes auf Zielwerte < 130/80 mmHg<sup>33</sup>. Dabei wurde in den Richtlinien der JNC-7 eine nach Nomogramm geschätzte GFR unter 60 ml/min per 1,73 m<sup>2</sup>, entsprechend einem Kreatinin Wert von >133 µmol/l (1,5 mg/dl) bei Männern oder >115 µmol/l (1,3 mg/dl) bei Frauen als chronische Niereninsuffizienz festgelegt. Außerdem gelten die Richtlinien auch für eine Albuminurie > 300 mg/d oder eine

Albumin/Kreatinin-Ratio >200 mg/g. Diese frühe und aggressive Senkung des Blutdrucks hat eine Verlangsamung der Progression der chronischen Nierenerkrankung sowie eine Reduktion anderer kardiovaskulärer Endorganschäden zum Ziel.

Zugrunde liegend für das progrediente Nierenversagen bei arterieller Hypertonie ist eine Abnahme der Anzahl funktionstüchtiger Nephronen durch eine Glomerulosklerose, eine tubulointerstitielle Fibrose und eine Gefäßsklerose. Nach einem kritischen Abfall der Nephronen unter 50% kommt es, unabhängig von der primären Ursache der Nierenerkrankung, zur intraglomerulären Hypertonie und somit zur Hyperfiltration in den restlichen Nephronen<sup>34</sup>.

Für einen gewissen Zeitraum kann mithilfe dieses hämodynamischen Mechanismus die glomeruläre Filtration aufrechterhalten werden. Allerdings beschleunigen diese glomeruläre Hypertonie und kompensatorische Hyperfiltration den Untergang des verbleibenden Nierenparenchyms<sup>34</sup>. Bei sekundären Hypertonieformen kommt es wegen dieser Schädigungssteigerung häufig zu einer „renalen Fixation“ der Hypertonie, die auch nach der Ausschaltung der ursprünglichen hypertensiven Stimuli persistiert. Am Auftreten einer Mikroalbuminurie ist die Schädigung der glomerulären Strukturen klinisch erkennbar.

Eine Mikroalbuminurie liegt definitionsgemäß bei einer Albuminausscheidung im Urin von 30-300mg/24h vor. Zwischen einer Mikroalbuminurie und der Manifestation einer chronischen Niereninsuffizienz bei Diabetikern besteht ein klarer Zusammenhang<sup>35</sup>. Ein Teil der Patienten mit essentieller Hypertonie fällt interessanterweise ebenfalls durch eine erhöhte Albuminausscheidung im Urin auf<sup>36</sup>. Verschiedene epidemiologische Studien weisen nach, dass Personen mit essentieller Hypertonie und Mikroalbuminurie sowohl erhöhte kardiovaskuläre Morbidität und Mortalität entwickeln<sup>37</sup>, als auch ein gesteigertes Risiko einer chronischen Niereninsuffizienz (cNI)<sup>38,37</sup>. Lange Zeit wurden Albuminurie und Proteinurie nur als Marker für glomerulären Schäden angesehen, sind aber höchstwahrscheinlich ein wichtiger unabhängiger Progressionsfaktor der hypertensiven Nephropathie an sich. Albuminurie und Proteinurie sind direkt mit einer, hauptsächlich durch das Renin-Angiotenin-System (RAS) vermittelten, glomerulären Hyperfiltration und glomerulärer wie auch tubulointerstitieller Fibrose assoziiert<sup>39</sup>. An Ratten durchgeführte Mikropunktionsstudien weisen nach, dass eine Blockade des RAS tubulointerstitielle und glomeruläre Schäden reduziert<sup>34,40</sup>. In den proximalen Tubuluszellen werden die filtrierte Proteine zum Teil wieder aufgenommen und können über Chemokinfreisetzung zu einer interstitiellen Entzündungsreaktion führen und somit einen perpetuierten Schädigungsprozess in Gang bringen<sup>40</sup>.

Eine Vielzahl kontrollierter doppelblinder klinischer Studien hat bei Patienten mit Diabetes mellitus und nicht-diabetischen Nierenerkrankungen für ACE-Hemmer und AT1-

Rezeptorantagonisten nachgewiesen, dass eine wirksame antihypertensive Therapie die Progression einer Niereninsuffizienz signifikant verzögern kann<sup>41,42,43,44,35</sup>.

Im *Irbesartan in Diabetic Nephropathy Trial* (IDNT) und in der *African American Study of Kidney Disease and Hypertension Study Group* (AASK) waren dem Ca-Antagonisten Amlodipin eine ACE-Hemmung oder eine AT<sub>1</sub>-Rezeptor-Blockade in der nephroprotektiven Potenz überlegen<sup>43,45</sup>. Im Vergleich zur Therapie mit dem  $\beta$ -Rezeptor-Blocker Atenolol kam es in der *UK Prospective Diabetes Study Group* (UKPDS) Studie zu keiner Verzögerung der Progression der chronischen Niereninsuffizienz<sup>44</sup>.

Die AASK konnte bemerkenswerterweise an 1094 einbezogenen afro-amerikanischen Hypertonikern nachweisen, dass eine antihypertensive Therapie mittels eines ACE-Hemmers signifikant besser nephroprotektiv wirksam ist als die Therapie mit einem Ca-Antagonisten oder  $\beta$ -Blocker<sup>19</sup>.

Die große pathophysiologische Bedeutung des RAS bei der Genese der hypertensiven Nephropathie und kardiovaskulärer Endorganschäden wird durch diese klinischen Untersuchungen eindrücklich belegt.

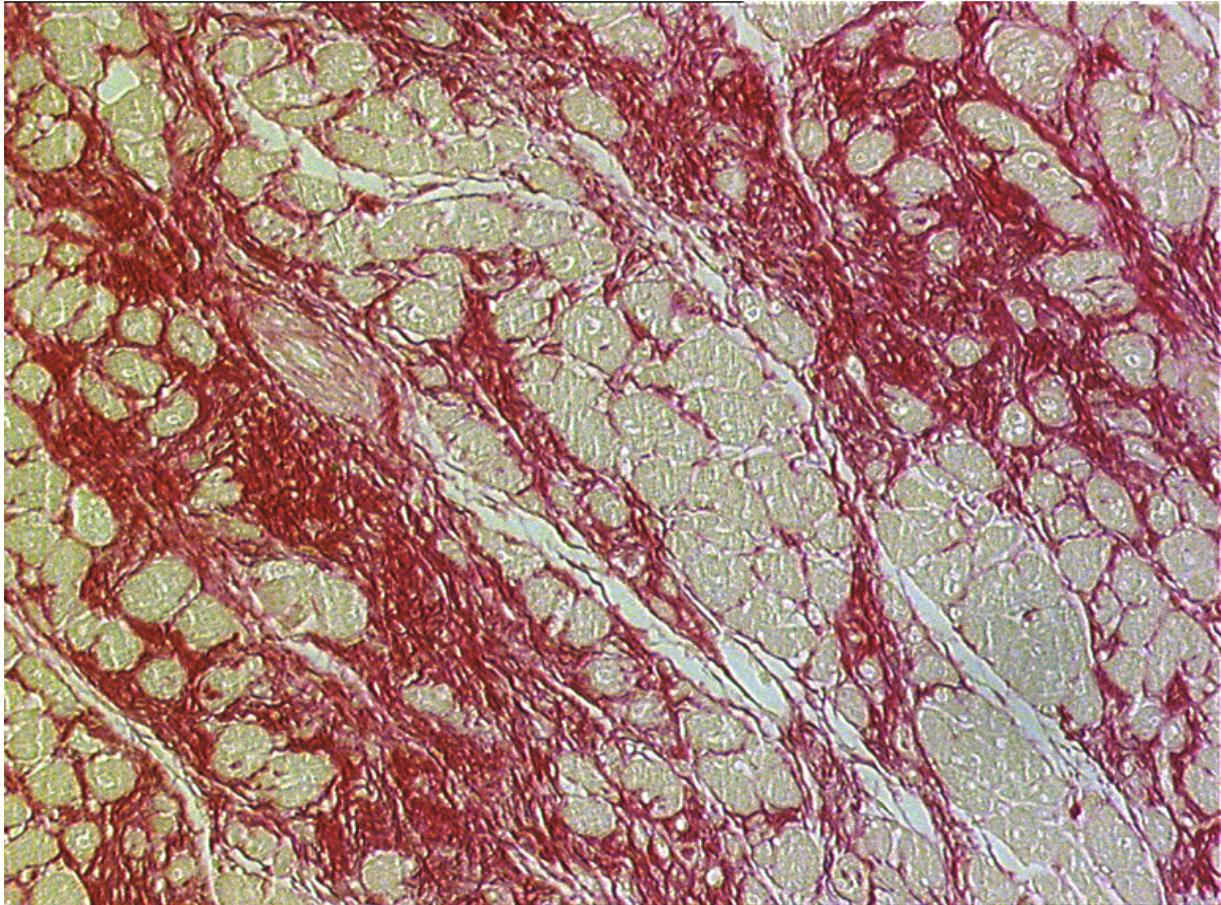
### **1.2.2. Linksherzhypertrophie und Herzinsuffizienz**

Die häufigste Manifestationsform einer hypertensiven Herzerkrankung ist die linksventrikuläre Hypertrophie (LVH). Durch die arterielle Hypertonie entsteht eine erhöhte Wandspannung im Bereich des linksventrikulären (LV) Myokards. Da nach der Laplace-Beziehung aus einer zunehmenden Wanddicke eine Verringerung der Wandspannung resultiert, reagiert der Ventrikel mit einer kompensatorischen Myokardhypertrophie. Die LVH ist also zunächst eine adäquate kompensatorisch-protective Reaktion. Anfangs führt diese kompensatorische Ventikelhypertrophie als physiologische Antwort des Herzens auf eine erhöhte Nachlast zu einer gesteigerten Kontraktilität des linken Ventrikels<sup>46,47</sup>. Während der Diastole kommt es zu einer Verlängerung der isovolumetrischen Relaxation, einer Verzögerung der schnellen Füllungsphase und zu einer erhöhten passiven Steifheit<sup>45</sup>.

Die darüber hinaus persistierende vermehrte ventrikuläre Wandspannung führt zu einer vermehrten Steifheit des Ventrikels und ist vorwiegend Folge einer Fibrosierung des kardialen Bindegewebes (Abbildung 3). Dieser Prozess wird als ventrikuläres „*remodeling*“ bezeichnet.

Im weiteren Verlauf führt eine gleichzeitige vermehrte Sklerose der großen epikardialen Koronargefäße („Makroangiopathie“) sowie der kleinen intrakardialen Widerstandsgefäße („Mikroangiopathie“) zu einem sich verstärkenden Missverhältnis zwischen Sauerstoffbedarf und -angebot am hypertrophierten Herzen. Der Schwellenwert einer myokardialen Ischämie

(Koronarreserve) ist somit herabgesetzt, wodurch die Inzidenz für Arrhythmien, einen Myokardinfarkt, eine manifeste Herzinsuffizienz, sowie plötzlichen Herztod stark ansteigt.



**Abbildung 3: Histologie des Myokards bei linksventrikulärem Remodeling.**

Als prädiktiver Parameter kardialer Morbidität und Mortalität hat eine hypertensive LVH somit einen hohen Stellenwert. Bei ca. 50% der Patienten mit nicht therapierter Hypertonie lässt sich EKG-morphologisch eine LVH nachweisen<sup>47</sup>. Bei der Hypertrophie lässt sich die konzentrische von der exzentrischen unterscheiden, wobei letztere durch die Dilatation der Herzhöhlen charakterisiert wird. Nach wirksamer antihypertensiver Therapie ist die als physiologischer Kompensationsmechanismus bestehende Myokardhypertrophie zunächst noch rückbildungsfähig. Die initial konzentrische LVH kann bei andauernder Druckbelastung in eine Dilatation übergehen und zur manifesten Herzinsuffizienz führen<sup>47</sup>.

Bei arterieller Hypertonie werden neben den direkten physikalischen Effekten der Volumen- und Druckbelastung auch wichtige Kaskaden des neurohumoralen Systems, von Zytokinen und Wachstumsfaktoren im Myokard aktiviert. Insbesondere dem sympathischen Nervensystem, dem Renin-Angiotensin- und dem Endothelin-System kommen hierbei entscheidende Bedeutungen zu<sup>48</sup>. Durch diese und andere Systeme werden intrazelluläre Hypertrophieprozesse in den Kardiomyozyten induziert, die über ein Wachstum der Einzelzellen zu einer Vergrößerung des

kompletten Herzens führen<sup>48</sup>. Des Weiteren erfolgt über die Stimulation kardialer Fibroblasten eine Änderung der extrazellulären Matrix (Abbildung 3).

Eine nicht ausreichend therapierte arterielle Hypertonie erhöht das Risiko des Auftretens einer manifesten Herzinsuffizienz auf das Dreifache<sup>49</sup>. Die pathophysiologischen Mechanismen für den Übergang von der LVH zur Herzinsuffizienz mit Pumpversagen sind bisher nicht hinlänglich geklärt. Eine mögliche pathophysiologische Ursache sehen Erklärungsansätze in der verminderten kardialen Kapillardichte und/oder der im Rahmen der LVH aufgetretenen Veränderung der extrazellulären Matrix (ECM) (Abbildung 3)<sup>50</sup>.

Eine wichtige Rolle bei der Genese der Herzinsuffizienz spielen Modifikationen der ventrikulären Struktur. Histologische Veränderungen schließen eine Hyperplasie der kardialen Fibroblasten, Hypertrophie der Kardiomyozyten, Apoptose und eine Vermehrung von inflammatorischen Zellen im Gewebe ein<sup>51</sup>. Durch die Ausbildung ausgedehnter fibrotischer Bereiche mit Zelluntergängen und interstitieller Fibrose kommt es zur physiologischen und morphologischen Desorganisation im insuffizienten Ventrikel (Abbildung 3) mit Störungen der elektrischen Synchronisation und einer verringerten Anzahl von Kardiomyozyten für den Kontraktionsprozess. Daher kommt es neben dem mechanischen Pumpversagen verstärkt zu Arrhythmien und plötzlichem Herztod.

Durch diese qualitativen und quantitativen Veränderungen der ECM (Abbildung 3) nimmt schließlich die Kammersteifigkeit zu. Das durch Aktivierung des lokalen RAS gebildete Mineralokortikoid Aldosteron spielt in diesem Zusammenhang eine wichtige Rolle<sup>52</sup>. Aldosteron vermittelt durch Bindung an den Mineralokortikoidrezeptor eine proliferative Wirkung auf myokardiale Fibroblasten<sup>53</sup>. Die durch die erhöhte Kammersteifigkeit hervorgerufene Verschlechterung der diastolischen Funktion des linken Ventrikels bewirkt eine Verminderung der Koronarreserve und eine Verschiebung der diastolischen Druck-Volumen-Kurve nach links. Die diastolischen Drucke sind bei identischen diastolischen Volumina und normaler Auswurfraction erhöht und führen somit zur Herabsetzung der diastolischen Ventrikelfüllung.

Die Zunahme der Fibrose führt auch zu Veränderungen im Bereich der Mikrozirkulation. Neben den Umbauprozessen des myokardialen Kompartiments mit interstitieller Fibrose kommt es über ischämiegetriggerte Aktivierung von radikalproduzierenden und proteolytischen Systemen zu einem vaskulären *remodeling*<sup>54</sup>. Mechanische Einflüsse wie arterielle Hypertonie führen zu einer Mediahypertrophie mit zunehmender Fibroseentwicklung und nachfolgender Lumeneinengung (Abbildung 3)<sup>54</sup>.

Mit der systolischen Dysfunktion beginnt die terminale hypertensive Herzerkrankung. Durch zunehmende Dilatation des linken Ventrikels wird die systolische Wandspannung überschritten

und/oder es kommt zum Auftreten einer Ischämie durch Zunahme der diastolischen Wandspannung. Charakteristisch für die systolische Dysfunktion ist ein gesteigerter enddiastolischer Kammerdruck bei verringerter Auswurffraktion. Eine systolische Dysfunktion tritt anders als die diastolische Dysfunktion erst bei Vorliegen einer exzentrischen Hypertrophie auf<sup>55</sup>.

Bei chronischer arterieller Hypertonie durchläuft das Herz also folgende drei Stadien: die initiale physiologische Kompensation mit LVH, die daran anschließende diastolische Dysfunktion und nach komplexem *remodeling* auf myokardialer und vaskulärer Ebene das dritte Stadium der systolischen Dysfunktion - das Terminalstadium.

An nicht-medikamentösen Maßnahmen auf die LVH ist für eine Reduktion des Körpergewichtes<sup>56</sup> und eine salzarme Kost ein positiver Effekt nachgewiesen<sup>57</sup>. Diese therapeutischen Maßnahmen sind jedoch meist nicht effektiv umsetzbar, sodass die medikamentöse Therapie nötig wird. Zahlreiche klinische Studien unterschiedlicher Qualität haben sich mit den Unterschieden zwischen den einzelnen Antihypertensiva befasst. Die Aussagekraft hinsichtlich der unterschiedlichen Wirkungen der Substanzgruppen wird durch Meta-Analysen erhöht, die alle zu dem identischen Schluss kommen, dass ACE-Hemmer, gefolgt von Ca-Antagonisten und Diuretika den  $\beta$ -Blockern hinsichtlich ihrer Wirkung auf die linksventrikuläre Masse überlegen sind<sup>58,59</sup>. Die Wirksamkeit der neuen AT1-Antagonisten ist der der ACE-Hemmer ebenbürtig<sup>60</sup>.

Mehrere doppelblind-randomisierte klinische Studien belegen die gute Wirksamkeit der AT1-Antagonisten<sup>61,62</sup>. Die LIFE-Studie (Losartan Intervention For Endpoint reduction in hypertension study) konnte eine Überlegenheit von Losartan gegenüber dem  $\beta$ -Blocker Atenolol hinsichtlich der LVH und der kardiovaskulären Morbidität und Mortalität bei gleicher Blutdruckreduktion nachweisen<sup>63</sup>.

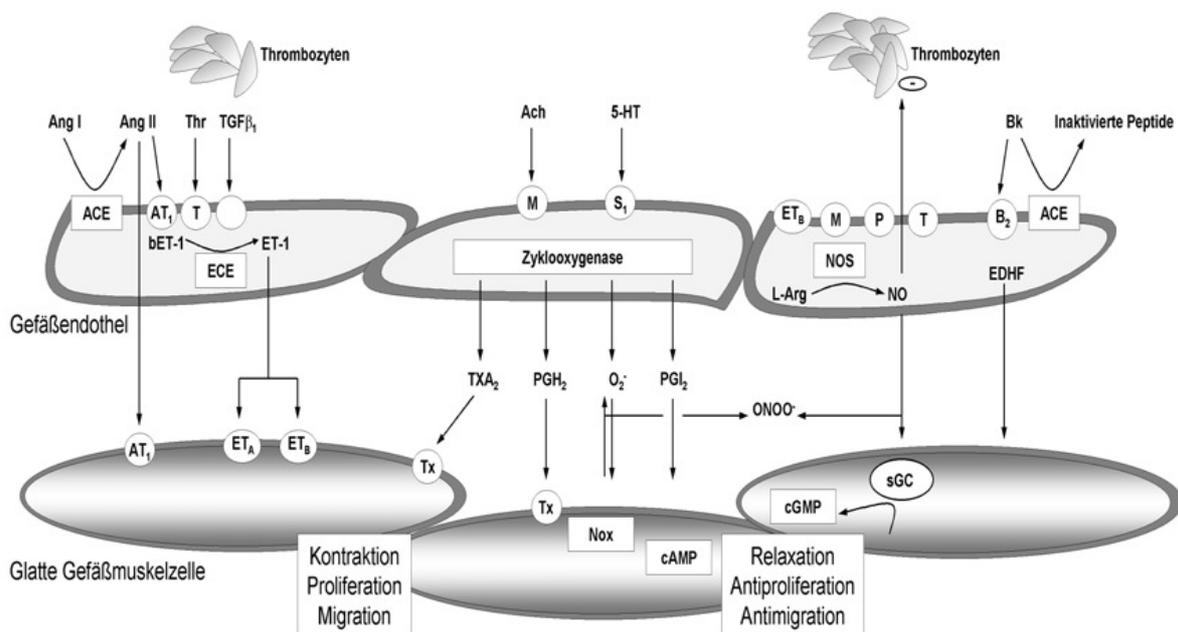
Da bei der Genese der LVH und der Herzinsuffizienz zahlreiche Pathomechanismen zusammenwirken, ist zusammenfassend nicht einer Substanzgruppe der unmittelbare Vorzug zu geben. Vielmehr wird die hauptsächliche therapeutische Wirkung durch eine adäquate Senkung der arteriellen Hypertonie erreicht.

### **1.2.3. Hypertensive Vaskulopathie**

Eine bestehende arterielle Hypertonie führt zu Störungen der Endothelfunktion und einem Anstieg des peripheren Widerstandes. Diese Mechanismen tragen beide sowohl zur Aufrechterhaltung und Verstärkung der Hypertonie als auch zur Manifestation der hypertensiven Endorganschäden maßgeblich bei.

Eine endotheliale Dysfunktion bewirkt funktionelle und strukturelle Veränderungen der Blutgefäße. Das Endothel der Gefäße ist durch die Bildung sowohl vasokonstriktorischer als auch vasodilatatorischer Substanzen maßgeblich an der Regulation des Gefäßtonus beteiligt. Hypertensive Endorganschäden manifestieren sich durch dessen Lage zwischen Blut und Gefäßmuskelschicht frühzeitig am Endothel.

Hormone, Neurotransmitter, Komponenten der Gerinnungskaskade und aus Thrombozyten freigesetzte Substanzen führen zu einer vom Endothel ausgehenden Vasodilatation (Abbildung 4). Am Endothel wirksame Scherkräfte verursachen zusätzlich eine endothelabhängige Dilatation. Das sehr kurzlebige Stickstoffmonoxid (NO, EDRF) ist gemeinsamer Mediator dieser Reaktionen.



**Abbildung 4: Vasoaktive Substanzen des Endothels**

**Vasodilatierende (rechts) und vasokontrahierende (links) Faktoren: Ang I / Ang II** Angiotensin I /II, **ACE** Angiotensin-Converting Enzym, **AT1** Angiotensin Subtyp1 Rezeptor, **Ach** Azetylcholin, **ADP** Adenosindiphosphat, **L-Arg** L-Arginin, **Bk** Bradykinin, **ECE** Endothelin-Converting-Enzym, **ETA** Endothelin Subtyp A Rezeptor, **ETB** Endothelin Subtyp B Rezeptor, **EDHF** endothelium-derived relaxing factor, **bET** Big-Endothelin, **ET** Endothelin, **5-HT** Serotonin, **M** muskarinischer Rezeptor, **Nox** NAD(P)H abhängige Oxidase; **NO** Stickstoffmonoxid, **ONOO-** Peroxynitrit; **PGH2** Prostaglandin H2, **O2-** Superoxidanion ; **PGI2** Prostacyclin, **S1** Serotonin, **sGC** lösliche Guanylatzyklase, **T** Thrombinrezeptor, **TGF β1** , transforming growth factor β1, **Thr** Thrombin, **Tx** Thromboxanrezeptor, **TXA2** Thromboxan A2 (modifiziert nach Lüscher et al.<sup>64</sup>).

Auch Vasokonstriktoren werden aus dem Endothel freigesetzt (Abbildung 4).

Endothelin, Thromboxan A2 und Prostaglandin H2, Angiotensin II (Ang II)<sup>65</sup> sowie das Superoxidanion (O<sub>2</sub>-)<sup>66</sup> sind die wichtigsten vom Endothel gebildeten Vasokonstriktoren.

Das Angiotensin-converting-Enzym (ACE) wird auf der Endothelzellmembran exprimiert und katalysiert die Umwandlung von Angiotensin I in Ang II (Abbildung 4). Des Weiteren baut ACE Bradykinin ab und beendet somit dessen vasodilatatorische Wirkung.

In der Beziehung zwischen Hypertonie und Arteriosklerose dient die endotheliale Dysfunktion als Bindeglied.

Neben der endothelialen Dysfunktion spielen ebenso strukturelle Veränderungen der Gefäßwand mit Änderungen des Lumen/Wanddicke-Verhältnisses und der Elastizität der Blutgefäße eine Rolle. Der Quotient aus Wanddicke/Lumendurchmesser der Arteriolen ist bei Hypertonikern signifikant niedriger als bei Normotonikern<sup>67</sup>. Zur Änderung der Wand-/Lumendurchmesser-Ratio führen Umbauvorgänge, die als vaskuläres *remodeling* bezeichnet werden. Quantitative und qualitative Änderungen der ECM, zelluläre Hypertrophie und Hyperplasie sowie durch Adhäsionsmoleküle veränderte interzelluläre Verbindungen haben Anteil an diesen Umbauvorgängen. Sie finden an großen wie kleinen Gefäßen statt<sup>68</sup>. Durch die medikamentöse Therapie von Hochdruckpatienten mit einem ACE-Hemmer wird das vaskuläre *remodeling* verhindert, unter  $\beta$ -Blockade mit vergleichbarer Blutdrucksenkung tritt hingegen diese vasoprotektive Wirkung nicht auf<sup>69</sup>.

Zusammengefasst kommt dem vaskulären *remodeling* eine entscheidende Rolle bei der Entstehung hypertensiver Endorganschäden zu. Daher zielen Strategien zur Therapie kardiovaskulärer Erkrankungen direkt oder indirekt auf die Verbesserung oder gar Wiederherstellung der vaskulären Integrität und Funktion.

### ***1.3. Hemmung des RAS***

Das Renin-Angiotensin-Systems (RAS) und seine Bedeutung als Mediator des arteriellen Blutdrucks und hochdruckinduzierter Endorganschäden sind in den letzten Jahren intensiv untersucht worden. Wurde ursprünglich das RAS als endokrines System verstanden, das seine Wirkung über das Effektorpeptid Angiotensin II (Ang II) ausübt, so belegen neuere Daten die Existenz eines lokalen, gewebeständigen RAS, das durch parakrin-autokrine Mechanismen wirkt.

Die Abspaltung des Dekapeptids Angiotensin I (Ang I) von seinem Substrat Angiotensinogen (Aogen) durch die Aspartylprotease Renin ist der erste Schritt in der Ang II-Bildung (Abbildung 5). Zweiter Schritt ist die Umwandlung von Ang I zum Oktapeptid Ang II durch das Angiotensin-Konversionsenzym (ACE). In manchen Geweben kann die Ang II-Bildung auch über alternative Wege erfolgen, beispielsweise über die Chymase des Herzgewebes<sup>70</sup> (Abbildung 5). Hauptsächlich erfolgt die Bildung von Ang II jedoch über das ACE<sup>71</sup>. Ang II wird durch verschiedene Enzyme wie Aminopeptidase [AngIII(2-8), Ang IV(3-8)] und Endopeptidase [Angiotensin (1-7)] zu aktiven und inaktiven Fragmenten abgebaut<sup>72</sup>. Im Gegensatz zu dem für

Angiotensinogen wird durch Renin zu Angiotensin I umgewandelt. ACE (Angiotensin-Konversionsenzym) spaltet Angiotensin I zu Angiotensin II und inaktivierte Produkte. Angiotensin II wirkt über AT<sub>1</sub>-, AT<sub>2</sub>- und AT<sub>X</sub>-Rezeptoren. ACE spaltet auch Bradykinin zu inaktivierten Produkten.

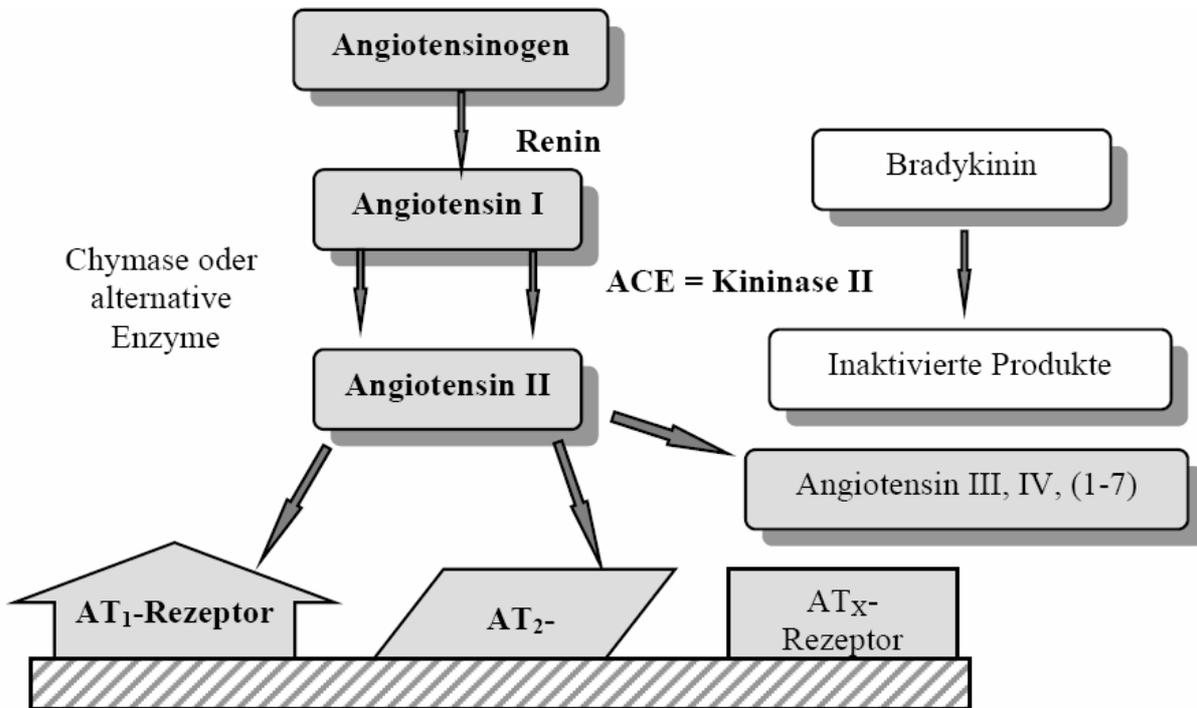


Abbildung 5: Darstellung des Renin-Angiotensin-Systems. ACE: Angiotensin-Konversionsenzym, AT<sub>1</sub>-Rezeptor: Angiotensin II Subtype 1-Rezeptor, AT<sub>2</sub>-Rezeptor: Angiotensin II Subtype 2-Rezeptor; AT<sub>X</sub>-Rezeptor: noch nicht identifizierter Angiotensin II Rezeptor Subtypen.

Zwei AT-Rezeptor-Subtypen (AT<sub>1</sub>, AT<sub>2</sub>) konnten durch spezifische nicht-peptid Antagonisten identifiziert werden. Die durch den AT<sub>1</sub>-Rezeptor vermittelten Effekte sind am besten untersucht: es handelt sich um einen G-Protein gekoppelten Rezeptor, der die Inositol-Diacylglycerol-Kaskade aktiviert und das intrazelluläre Ca<sup>2+</sup> erhöht oder mit dem Adenylatzyklase-System interagiert.

Bei der Pathogenese der arteriellen Hypertonie spielen unterschiedliche Wirkungen des Ang II eine Rolle. In der Niere hat Ang II Anteil an der Regulation der glomerulären Filtrationsrate und erhöht die proximal tubuläre Natrium- und Bikarbonatrückresorption. Eine Aktivierung des RAS bei chronischen Nierenerkrankungen ist gut belegt<sup>73</sup>. Der Tonus des *vas efferens* wird durch Ang II stärker erhöht als der des *vas afferens*, was zu einer Erhöhung des glomerulären Kapillardrucks führt. Daraufhin kommt es zu einer Größenzunahme der Poren der glomerulären Wand<sup>74</sup>. Sowohl ACE-Hemmer als auch AT<sub>1</sub>-Rezeptor-Antagonisten können den glomerulären Hochdruck und die gestörte Barriere-Selektivität für Makromoleküle normalisieren<sup>75</sup>.

Im vaskulären System bewirkt die Gabe von Ang II eine Konstriktion der Widerstandsgefäße und einen Anstieg des totalen peripheren Widerstandes. In peripheren Effektorzellen verstärkt Ang II die Antwort auf Noradrenalin und hat auf das Herz, bedingt durch eine Steigerung des

Ca<sup>2+</sup>-Ionen-Einstroms während der Plateauphase des Aktionspotentials, eine positiv inotrope Wirkung. Bei der Manifestation der LVH und LV Dysfunktion hat das RAS eine besondere Bedeutung<sup>76</sup>. Dabei spielen neben der Senkung der Nachlast wohl auch andere blutdruckunabhängige lokale Wirkungen des RAS auf die Zusammensetzung der extrazellulären Matrix des Herzens und auf die Proliferation der Kardiomyozyten eine Rolle.

In der Nebenniere stimuliert Ang II Synthese und Sekretion von Aldosteron. Im zentralen Nervensystem fördert Ang II die Ausschüttung von Vasopressin und ACTH, steigert die Aktivität des sympathischen Nervensystems und hat Anteil an der Durstregulation.

Zusammengefasst nimmt das RAS eine zentrale Rolle bei der Pathophysiologie der arteriellen Hypertonie und der hypertensiven Endorganschäden ein.

#### ***1.4. Hemmung der Vasopeptidase***

Die Vasopeptidaseinhibitoren stellen eine neue Substanzgruppe dar und kombinieren das Prinzip der klassischen ACE- Hemmung mit der Hemmung der Neutralen Endopeptidase (NEP) in einem Molekül.

Die NEP ist wie das ACE eine membrangebundene Metalloprotease. Sie kommt in vielen Organen und Geweben vor, wobei sich hohe Aktivitäten im ZNS, in der Niere, der Gefäßwand und in Leukozyten finden. Die NEP ist das wichtigste Enzym für den Abbau der Natriuretischen Peptide, die physiologisch für eine Vasodilatation sorgen. Weitere Substrate der NEP sind Ang I und Ang II, Kinine, Substanz P, Adrenomedullin, Endothelin (ET), chemotaktische Peptide, Enkephaline und das Amyloid-β-Peptid<sup>77,78</sup>. Es dürfte auch zur Bildung von ET aus seiner Vorstufe big-ET beitragen, wobei das Endothelin-Conversions-Enzym (ECE) wohl eine weit wichtigere Rolle in der ET-Bildung spielt<sup>79</sup>.

Zu den Natriuretischen Peptiden zählen drei Peptidhormone: das „atriale“ (ANP), das „brain“ oder „B-Typ“- (BNP) und das „C-Typ“-Natriuretische Peptid (CNP) (Abbildung 6). Die Bildung dieser Peptide erfolgt bei mechanischer Dehnung im Vorhof- (ANP) und im Ventrikelmyokard (BNP) und bei Scherbelastung im Endothel (CNP). Dabei vermitteln nur ANP und BNP neben der lokalen auch humorale Wirkungen. Die NPs bewirken eine Vasodilatation über eine direkte Aktivierung der Guanylatcyclase der glatten Muskelzellen und erhöhen die renale Salz- und Wasserausscheidung. Des Weiteren bewirken sie eine Senkung der zentralen Sympathikusaktivität sowie die Hemmung der Renin-Aldosteronsekretion und von Proliferationsprozessen. Die Regulation des Blutdruckes und des Elektrolythaushaltes scheinen die physiologische Hauptwirkung der NPs auszumachen, da genetisch defiziente Mäuse eine Hypertonie und Myokardhypertrophie entwickeln<sup>80</sup>. Die Stimulation des NP-Systems bei

Hypertonie und Herzinsuffizienz wird als physiologischer kompensatorischer Mechanismus angesehen.

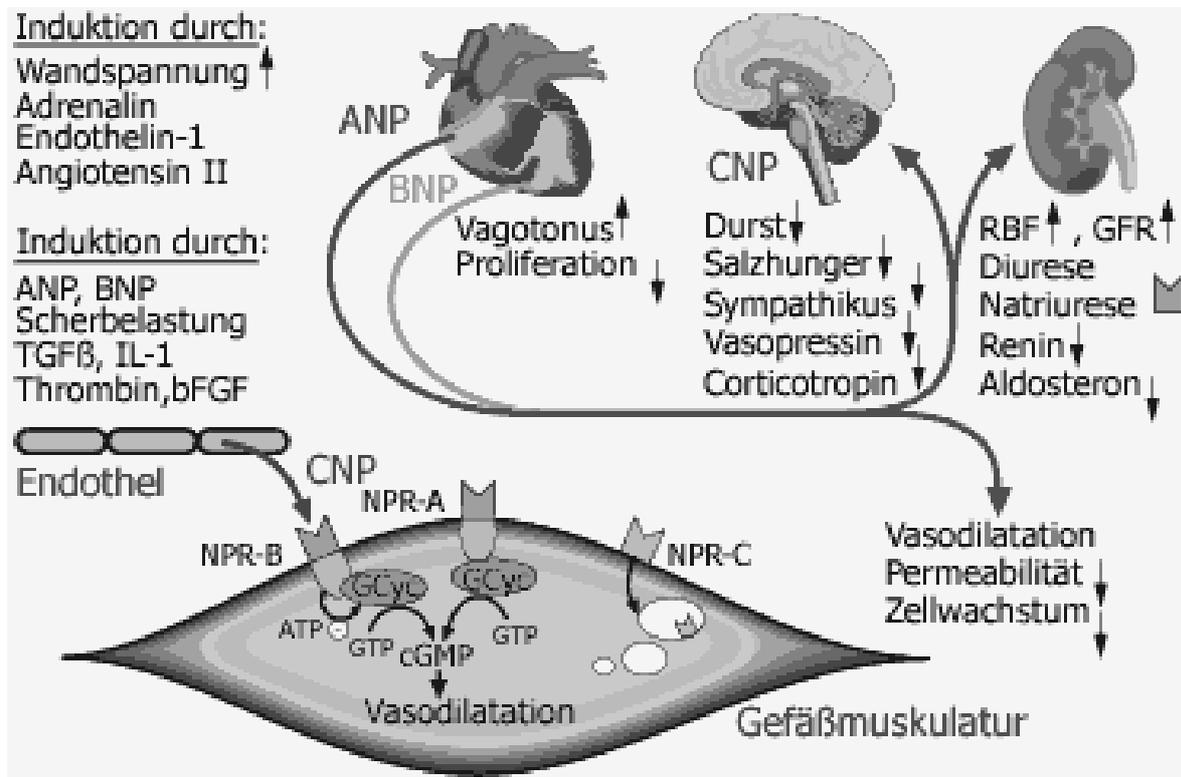


Abbildung 6: Bildung und Wirkung der Natriuretischen Peptide (modifiziert nach Dendorfer<sup>81</sup>)

Eine selektive Hemmung der NEP bewirkt eine Natriurese<sup>82</sup> aber hat sehr variablen Einfluss auf den Blutdruck<sup>83</sup>. Für die geringe vasodilatatorische Wirkung werden die vasokonstriktorischen Enzyme Ang II und ET-1 verantwortlich gemacht, die auch durch die NEP-Inhibition akkumulieren. Durch eine gleichzeitige ACE-Hemmung sollte dieser vasokonstriktorische Effekt aber vermieden werden können, da Angiotensin II durch seine eingeschränkte Bildung nicht mehr wirksam akkumulieren kann. Somit entfällt auch ein wichtiger Aktivierungsmechanismus des Endothelinsystems.

Daher erscheint eine kombinierte Inhibition der beiden Enzyme sinnvoll. Durch die biochemische Verwandtschaft von ACE und NEP konnten Substrate entwickelt werden, die beide Enzyme mit gleicher Affinität inhibieren. Da ACE-Hemmer den Blutdruck besonders effektiv bei aktiviertem RAS senken, eine Suppression dieses Systems hingegen auf eine Volumen- und Salzretention hinweist, kann die NEP hier gut ergänzend wirken.

Durch die zahlreichen Stoffwechselwirkungen der beiden Enzyme ist jedoch eine intensive Untersuchung der Wirkungen besonders wichtig, um eventuelle Nebenwirkungen abschätzen zu können. So ist beispielsweise durch die gesteigerte Zunahme an Kininen bereits ein erhöhtes Risiko für Angioödeme nachgewiesen<sup>84</sup>.

### **1.5. Zielstellung dieser Arbeit**

Absicht der vorliegenden Arbeit ist es, die protektive Wirkung einer Vasopeptidasehemmung auf renale und kardiale Endorganschäden im Niereninsuffizienzmodell mit verminderter Nephronenanzahl zu untersuchen.

Ausgehend von den hämodynamischen Veränderungen nach 5/6-Nephrektomie werden in dieser Arbeit verschiedene morphologische und histologische Parameter am Nierengewebe und Herzgewebe des linken Ventrikels nach Vasopeptidasehemmung im Vergleich zu AT1-Blockade untersucht.

Im Detail werden folgende Parameter untersucht:

- Höhe des systolischen Blutdrucks
- Kreatininclearance und Albuminurie als Parameter der Nierenfunktion
- Histologische Veränderungen an der Niere:
  - Glomerulosklerose
- Ausmaß der linksventrikulären Hypertrophie
- Histologische Veränderungen am linken Ventrikel
  - Interstitielle Fibrose
  - Perivaskuläre Fibrose

## **2. Material und Methoden**

### **2.1. Material**

#### **2.1.1. Lösungen**

Coating-Lösung	Rattenserum-Albumin	0,2 mg/ml
	Natriumhydrogencarbonat	0,1M
Fixierlösung für Nieren (Methacarn)	Methanol	60 ml
	Chloroform	30 ml
	Eisessig	10 ml
Fixierlösung für linken Ventrikel	Ethanol 80 %	150 ml
	Pikrinsäure	1 g
	Formaldehyd 37 %	60 ml

	Eisessig	5 ml
Rattenantikörper	mit Puffer A verdünnt 1:9000	
Puffer A	Diethylmalonsäure	20 mM
	Natriumchlorid	150 mM
	Di-Natrium-EDTA - Dihydrat	0,1 mM, pH 8,0 0,1% , w/v
	Tween 20	
	ad 800 ml Aqua bidest.	
	1 M Kaliumchlorid	
	pH 7,4	
	ad 1 l Aqua bidest.	5 g
	Gelatine	
Rattenserum-Albumin- Stammlösung	Rattenserum-Albumin	1,0 mg/ml
	Natriumhydrogencarbonat	0,1M
Substratlösung	3,3',5,5' TMB	2 Tabletten
	Aqua bidest.	10 ml
	Puffer A	10 ml
	Wasserstoffperoxid	4 µl
Schwefelsäure	2 M	

### 2.1.2. Chemikalien und Medikamente

Substanz	Firma
Olmesartan	Bristol-Meyers Squibb
Omapatrilat	Bristol-Meyers Squibb
2-Propanol 70 %	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Bepanthen Augensalbe	Roche, Grenzach-Wyhlen
Esketaminhydrochlorid 43mg/kg KG (Ketanest S 25 mg/ml)	Parke-Davis, nun Pfizer Pharma GmbH, Karlsruhe
Novaminsulfon	Ratiopharm GmbH, Ulm
Paracetamol-Saft	Ratiopharm GmbH, Ulm
Schwefelsäure 96 %, v/v	Merck KGaA, Darmstadt

Tween 20 BioRad,	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Xylazin Hydrochlorid 13 mg/kg KG	Bayer Vital GmbH Leverkusen
Rompun 2 %	
Rattenserum-Albumin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Albumin-Rat Polyclonal Antibody	ICN Pharmaceuticals Germany GmbH, Frankfurt
Gelatine (75 bloom)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Ethanol	Mallinckrodt Baker Chemikalen, Groß-Gerau
Formaldehyd 37 %, v/v	Mallinckrodt Baker Chemikalen, Groß-Gerau
Pikrinsäure Merck	Merck KGaA, Darmstadt
Chloroform	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Diethylmalonsäure 98 %, w/w	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Natriumchlorid	Merck KGaA, Darmstadt
Di-Natrium-EDTA-Dihydrat (Titrierkomplex III, MG=372,24)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Wasserstoffperoxid 30 %, v/v	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Natriumhydrogencarbonat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Isotone Natriumchloridlösung 0,9 %	B.Braun Melsungen AG, Melsungen
Povidon-Iod (Braunol)	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Essigsäure 100 %	Merck KGaA, Darmstadt
Methanol	Mallinckrodt Baker Chemikalen, Groß-Gerau Baker,
3,3',5,5' Tetramethylbenzidin-Dihydrochlorid (TMB) Tabletten	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Histoclear	Shandon
Paraffin, Paraplast Plus	Sherwood Meical Co
Perjodsäure	Merck
Schiff's Reagenz	Merck
Pikrinsäure	Merck
Sirius-Rot F3BA	Chroma

### 2.1.3. Instrumente und Nahtmaterial

Anatomische Pinzette Standard BD 47/ BD 35	Aesculap AG & Co. KG, Tuttlingen
Chirurgische Pinzette Standard BD 557	Aesculap AG & Co. KG, Tuttlingen
Chirurgische Schere Standard-Modell BC 320	Aesculap AG & Co. KG, Tuttlingen
Feine Präparierschere BC 2	Aesculap AG & Co. KG, Tuttlingen
Sterican Kanülen Gr.1, Gr. 12, Gr. 26	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Micro-Pinzette Uhrmacher Modell BD 329	Aesculap AG & Co. KG, Tuttlingen
Mikro-Nadelhalter Barraquer FD 230	Aesculap AG & Co. KG, Tuttlingen
Nadelhalter Crile-Murray BM 219	Aesculap AG & Co. KG, Tuttlingen
Wundspreizer Mellinger OA 241	Aesculap AG & Co. KG, Tuttlingen
Nahtmaterial Perma Handseide 0	Sutupak, Ethicon, Norderstedt
Nahtmaterial geflochten 3-0, Dexon II	B. Braun-Dexon GmbH, Tuttlingen
Nahtmaterial Monofilament 6-0, Biosyn	Tyco Healthcare, Basingstoke, UK
Sterile Einwegspritzen 2 ml, 5 ml, 10 ml	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Sterile Einwegspritzen 1 ml	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg

### 2.1.4. Geräte

Analysewaage	Satorius AG, Göttingen
Blutdruckmessgerät	TSE, Bad Homburg
ELISA-MRX-Plate-Reader	Dynex Technologies, Inc. Chantilly, USA
Haarschneider	Braun, Kronberg
Mikrotiterplattenschüttler	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Neigungswaage	Bizerba, Sauter KG. Ebingen

Präzisionswaage	Satorius AG, Göttingen
Zentrifuge, Tischzentrifuge 5415C, 5417R	Eppendorf AG, Hamburg
Färbeautomat Robet-Stainer HM 760	Microm
Histokinettenautomat	British American Optical Co.Ltd.
Photomikroskop Axiophot	Carl Zeiss, Oberkochen
Power Macintosh 8200/120	Apple Computer
Rotationsmikrotom HM 355	Microm
Videosystem	AVT-Horn

### 2.1.5. Sonstige Materialien und Futtermittel

Glasgefäße mit Schraubverschluss, 20 ml Econo Glas	Packard BioScience, jetzt PerkinElmer, Wellesley, USA
Haltungsfutter für Ratten	Ebeco, Castrop-Rauxel
Kryobox	
Leukosilk 2,5 cm	Beiersdorf, Hamburg
Makrolonkäfige	Ebeco, Castrop-Rauxel
Messzylinder	Schott Duran GmbH & Co. KG, Mainz
Pipette Reference 10-100 µl, 100-1000 µl	Eppendorf AG, Hamburg
Reaktionsgefäße Safe-Lock 1,5 ml, 2 ml	Eppendorf AG, Hamburg
Standardtips 20 µl, 100 µl, 1000 µl	Eppendorf AG, Hamburg
Sterile Mullkompressen 5 x 5 mm	Lohmann Rauscher International GmbH & Co. KG, Rengsdorf
Stoffwechselkäfige für Ratten	Techniplast Deutschland GmbH, Hohenpeißenberg
Thermo-Fast 96-Mikrotiterplatten	ABgene Deutschland, Hamburg
Untersuchungshandschuhe, Safeskin PFE	Hakle-Kimberly Deutschland GmbH, Mainz
Wattestäbchen 15 cm	Lohmann Rauscher International GmbH & Co. KG, Rengsdorf
Glasplatte, zugeschnitten, gerader Schliff	
Objektträger	Menzel Gläser
Szintillationsgefäße aus Glas	Packard

## **2.2. Methoden**

### **2.2.1. Tierexperimentelle Untersuchungen**

Die tierexperimentellen Untersuchungen wurden über einen Zeitraum von insgesamt acht Monaten durchgeführt. Die Eingriffe erfolgten unter Einhaltung des deutschen Tierschutzgesetzes und standen im Einklang mit den Richtlinien für Tierversuche des Instituts für Klinische Pharmakologie, Campus Benjamin Franklin, Charité, Berlin. Unter der Genehmigungsnummer G 0093 / 01 wurden die beschriebenen Tierversuche durch das Landesamt für Arbeitsschutz, Gesundheitsschutz und technische Sicherheit Berlin genehmigt. Die Eingriffe erfolgten sämtlich nach dem nach den Richtlinien festgelegten methodischen Vorgehen. Je nach Gruppenzugehörigkeit wurden die Tiere dem entsprechenden gruppenspezifischen operativen wie postoperativen *Procedere* unterzogen.

#### **2.2.1.1. Tierstamm und Haltung**

Wir verwendeten für die Studie ausschließlich männliche Wistar-Ratten, ein gesunder Rattenstamm, welche über die Charles River Deutschland GmbH bezogen wurden. Die Tiere wurden in der Forschungseinrichtung für experimentelle Medizin der FU Berlin (FEM) gehalten und versorgt. Die in 2.2.1.2 beschriebene Operation sowie die in 0 beschriebene Blutdruckmessung wurde in eigens hierfür vorgesehenen Räumen der FEM durchgeführt.

Während der vierwöchigen Versuchsdauer wurden je drei bis sechs Tiere in Makrolon-Gemeinschaftskäfigen gehalten und versorgt. Hierbei war der Zugang zu Futter und Wasser *ad libitum* zu jeder Zeit gegeben. In den Tierställen herrschten konstante Bedingungen. Die Temperatur lag bei 20-22° C, die Luftfeuchtigkeit lag bei 50%. Durch eine zeitlich gesteuerte Beleuchtungsperiodik wurden Hell-Dunkel-Phasen von jeweils zwölf Stunden erzeugt und somit ein physiologischer Tag-Nacht-Rhythmus aufrechterhalten. Die Tötung der Tiere sowie die Organentnahme wurde in den Räumen der klinischen Pharmakologie im Universitätsklinikum Benjamin Franklin der FU Berlin durchgeführt. Zu diesem Zweck wurden die Tiere in ihren Käfigen aus der FEM in die Klinik überführt und dort zur Akklimatisierung für 24 Stunden ungestört belassen, bevor die abschließenden Untersuchungen durchgeführt wurden. Während der gesamten Versuchsdauer wurde der Allgemein- und Ernährungszustand der Tiere täglich kontrolliert. Hierbei wurden Aktivität, Fellzustand und allgemeiner Eindruck als Parameter herangezogen. Im Fall einer deutlichen Aktivitätsminderung und Verschlechterung des

Allgemeinzustandes einzelner Exemplare wurden diese zur Verhinderung von unnötigem Leiden eingeschläfert.

#### **2.2.1.2. OP-Technik**

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

#### **2.2.1.3. OP-Vorbereitung**

Nach dem Transport vom Tierstall in den Vorbereitungsraum wurden die Tiere aus den Gemeinschaftskäfigen in Einzelkäfige umgesetzt, gewogen und entsprechen ihrem individuellen Gewicht narkotisiert. Die Anästhesie erfolgte durch intraperitoneale Injektion von Ketanest S 25 in einer Dosis von 0,172mg/100g Körpergewicht sowie Xylazin 2% in einer Dosis von 0,065mg/100g Körpergewicht. Im Anschluss an die Injektion wurden die Tiere in die Einzelkäfige zurückgesetzt und engmaschig beobachtet. In Einzelfällen mussten Anästhetika in niedriger Dosierung nachapplied werden.

Nach Eintritt der Narkose etwa 10-15 Minuten nach Injektion wurden die Tiere großflächig im Bereich des Abdomens rasiert und in den Operationsraum überführt. Dort wurden sie atraumatisch in Rückenlage auf der Operationsunterlage fixiert und der zuvor rasierte Bereich mit jodhaltiger Desinfektionslösung desinfiziert. Mit Hilfe einer anatomischen Pinzette wurde die Zunge manuell extrahiert, um eine ausreichende Spontanatmung zu gewährleisten und eine Verlegung der oberen Atemwege im Verlauf der Operation zu verhindern. Zum Schutz vor Austrocknung der Augen wurde eine panthenolhaltige Augensalbe appliziert.

#### **2.2.1.4. Technik der 5/6-Nephrektomie**

Voraussetzung für den Beginn der Operation war eine adäquate Narkosetiefe, welche durch Setzen von Schmerzreizen mittels einer chirurgischen Pinzette in eine Pfote bestimmt werden

konnte. Bei Ausbleiben eines Schmerzreflexes erfolgte der erste Schnitt der OP. Hierzu wurde eine mediane Laparotomie mit Spaltung von Haut, Muskulatur, Faszie und Peritoneum durchgeführt, um freien Zugang zur Bauchhöhle zu erhalten. Magen, Darm, Leber und Milz konnten durch Einsatz von Wattestäbchen nach lateral und cranial verdrängt und mit stumpfen Haken fixiert werden. Somit wurde eine gute Übersicht über die zunächst zu präparierende linke Niere gewährleistet. Die Präparation der linken Niere gestaltete sich aufgrund des längeren Gefäßstranges, der tieferen Lage sowie der ausbleibenden Verdrängung durch die Leber im Vergleich zur rechten Niere einfacher. Ziel war die Ligatur von ein bis zwei Seitenästen der Arteria renalis sinistra zur Unterbindung der Blutversorgung der ihnen zugeordneten Parenchymanteile. Hierzu wurde hilusnah das auf dem Gefäßstrang liegende Peritoneum parietale inzidiert und mitsamt peritonealem Fettgewebe entfernt. Im nächsten Schritt erfolgte die Darstellung der Arteria renalis sowie ihrer Aufteilung in einen ventralen und dorsalen Hauptstamm. Durch kurzzeitiges Abklemmen der dargestellten Äste war eine Zuordnung zu den jeweils versorgten renalen Parenchymanteilen möglich. Diese äußerte sich in der sofortigen ischämischen Aufhellung des nicht mehr durchbluteten Nierenareals. Auf diese Weise wurde es möglich, durch gezielte Identifikation und konsekutive Ligatur einzelner arterieller Seitenäste die Perfusion von letztlich ca. 2/3 der linken Niere dauerhaft zu unterbinden. Die livide Verfärbung des untergegangenen Parenchymanteils als Zeichen seiner Infarzierung ca. fünf bis zehn Minuten nach der Ligatur verifizierten den OP-Erfolg.

Nach regelgerechter Ligatur der A. renalis sinistra konnte im nächsten Schritt mit der Präparation der rechten Niere begonnen werden. Hierfür wurden zunächst abermals benachbarte Organe in der oben beschriebenen Weise mit Wattestäbchen und stumpfem Haken verdrängt. Die rechte Niere wurde unter Schonung der Nebenniere, der Leber und des rechten Nervus femoralis stumpf aus ihrem Lager herauspräpariert. Nach ihrer Freilegung konnte im nächsten Schritt der gesamte Gefäßstamm mitsamt Ureter mittels Ligatur unterbunden werden. Zur Vermeidung von Nahtinsuffizienzen und der daraus resultierenden Gefahr von tödlichen Nachblutungen wurde die erste Ligatur durch eine zweite weiter medial in Richtung Aorta verstärkt. Dies geschah unter Verwendung einer gebogenen Pinzette sowie einer nichtresorbierbaren Handseide der Stärke 0. Zuletzt wurde die Niere mit einer stumpfen Pinzette gegriffen, Gefäßstamm und Ureter mit einer Präparierschere weit distal durchtrennt und das Organ auf diese Weise komplett entfernt. Nach Kontrolle des Gefäßstumpfes auf Nahtinsuffizienzen war die operative Reduktion des Nierengewebes um 5/6 abgeschlossen. Nach nochmaliger Kontrolle des OP-Erfolges auf der Gegenseite wurde mit dem Verschluss der Bauchhöhle begonnen. Der Verschluss von Peritoneum und Muskelfaszie erfolgte durch

fortlaufende Naht mit resorbierbarem Nahtmaterial. Die Hautwunde wurde mittels fortlaufender Naht intrakutan vernäht, um eine Eröffnung durch das Tier zu vermeiden. Zuletzt wurde der einzig zugängliche Knoten der Naht mittels eines Hautlappens gedeckt. Die Eröffnung der Wunde durch das Tier selbst oder die Artgenossen konnte auf diese Weise in allen Fällen verhindert werden.

Nach Desinfizieren der Wunde wurde das Tier in einem vorgewärmten, mit Zellstoff ausgelegten Käfig in Seitenlage bis zum Abklingen der Anästhesie beobachtet, um einer möglichen Ateminsuffizienz durch Aspiration und Verlegung der oberen Atemwege begegnen zu können. Postoperativ wurden die Tiere erneut in Gemeinschaftskäfigen zu zwei bis sechs Individuen gehalten. Hierbei bestand Zugang zu Wasser und Nahrung ad libitum. Eine postoperative Analgesie war durch im Trinkwasser gelöstes Paracetamol in den ersten drei postoperativen Tagen gewährleistet.

### 2.2.1.5. Gruppeneinteilung und Studiendesign

Die Einteilung in die entsprechenden Gruppen zeigt Tabelle 1. Die Ratten der Gruppe KoSham wurden sham-operiert. Wistar-Ratten der Gruppe Nx wurden einer subtotalen Nephrektomie (Nx) unterzogen. Ratten der Gruppe NxAT1 erhielten nach erfolgter subtotaler Nephrektomie ab dem Operationstag täglich einen Angiotensin Rezeptor Blocker. Ratten der Gruppe NxAVE erhielten nach erfolgter subtotaler Nephrektomie ab dem Operationstag täglich einen Vasopeptidaseinhibitor - Omapatrilat (AVE). Über das Futter erhielten die Ratten den ATB Olmesartan in einer Dosierung von 10 mg/kg KG bzw. den Vasopeptidase-Inhibitor in einer Dosierung von 36mg/kg KG. Die Medikation wurde bis zum Tötungstag am Ende der vierten postoperativen Woche beibehalten. Je nach Gruppenzugehörigkeit unterzog man die Ratten dem entsprechenden gruppenspezifischen operativen wie postoperativen Procedere.

<b>Protokoll-Gruppe</b>	<b>Stamm</b>	<b>Nephrektomie</b>	<b>Therapie</b>	<b>Anzahl</b>
Ko Sham	Wistar	Nein	Keine	22
Nx	Wistar	Ja	Keine	11
Nx AT1	Wistar	Ja	Olmesartan (10 mg/kg KG)	13
Nx AVE	Wistar	Ja	Omapatrilat (36mg/kg KG)	21

**Tabelle 1: Gruppeneinteilung**

### **2.2.2. Blutdruckmessung**

Die Messungen wurden am wachen Tier mittels Schwanzplethysmografie nicht invasiv durchgeführt. Es handelte sich um eine automatisierte, computergestützte, oszillatorische Technik mit einem Blutdruckmessgerät der Firma TSE Bad Homburg.

Einzelnen wurden die Tiere in einen vorgewärmten Restraint, einen röhrenartigen Metallkäfig, gebracht, aus dem lediglich der Schwanz herausragte.

In dieser Konstruktion kommt das Tier nun in einen vorgewärmten Behälter und nach 30 Minuten Aufwärmphase bei 38 °C konnten eine Blutdruckmanschette und ein Transducer am Schwanz des Tieres angebracht werden.

Zur Gewöhnung an diese Bedingungen wurden die Messungen an drei aufeinander folgenden Tagen durch denselben Untersucher, unter gleichen Bedingungen und zu möglichst ähnlicher Tageszeit durchgeführt. Es erfolgten jeweils drei Messungen. In jeder Messung wurden zwei Werte für den systolischen Blutdruck bestimmt, wobei daraus als Ergebnis einer Messung der Mittelwert gebildet wurde. Die Daten der Messungen wurden dann auf einen Computer übertragen und pro Individuum gemittelt.

### **2.2.3. Bestimmung von Kreatininclearance und Albuminurie**

#### **2.2.3.1. Gewinnung des 24h-Urin**

In der vierten postoperativen Woche wurde ein 24-Stunden-Urin gewonnen. Hierzu mussten die Tiere über 24 Stunden in einen Stoffwechselkäfig gesetzt werden. In diesem Käfig hatten die Tiere freien Zugang zu Nahrung und Wasser. Der ausgeschiedene Urin wurde darin vom Kot getrennt und in ein Glasgefäß abgefüllt. Die Bestimmung des Volumens erfolgte durch Auswiegen: 1 g Urin ~ 1 ml Urin. Nach der Entnahme aus dem Stoffwechselkäfig wurde ca. 1 ml Urin in ein 1,5 ml Eppendorf-Gefäß dekantiert, welches dann bei 900 U/min für zehn Minuten zentrifugiert wurde, um eventuelle Verunreinigungen der Urinproben zu entfernen. Zur Aufbewahrung wurde der restliche Urin in Kunststoffgefäße gegeben und bei -20 °C gelagert.

#### **2.2.3.2. Bestimmung der Cratininclearance**

Es wurde im Labor der Klinischen Pharmakologie, Charité-Universitätsmedizin Berlin, Campus Benjamin Franklin, aus dem 24-Stunden-Urin das Gesamtprotein nach der Bradford-Methode<sup>17</sup> bestimmt.

Sowohl im 24-Stunden-Urin als auch in dem bei der Tötung entnommenen Serum wurden das Kreatinin gemessen und später die Kreatinin-Clearance berechnet.

Diese Messungen erfolgten über Standardmethoden durch die Labor 28 AG, Mecklenburgische Strasse 28, 14197 Berlin.

Die Berechnung der Kreatinin-Clearance erfolgte nach der Formel:

$$\text{Kreatinin-Clearance} = \frac{\text{Urinkonzentration von Kreatinin} \times \text{Harnvolumen}}{\text{Plasmakonzentration von Kreatinin} \times \text{Zeit}}$$

#### **2.2.3.3. Albuminbestimmung**

Die Messung der Albuminurie erfolgte über eine direkte Bestimmungsmethode, einen „enzyme linked immunosorbent assay“ (ELISA). Die Methode wurde im Institut für Klinische Pharmakologie, Charité Universitätsmedizin Berlin, Campus Benjamin Franklin, etabliert.

Der ELISA, bei dem eine Farbreaktion katalysiert wird, wodurch das Albumin photometrisch bestimmt werden kann, findet in einer 96-Loch Mikrotiterplatte statt. Hierzu wurden 100 µl des

albuminspezifischen Antikörpers („Coating-Lösung“) pro Loch in die Mikrotiterplatte pipettiert. Es folgte eine Inkubation der Platte: Drei Stunden bei 37 °C und 15 Stunden bei 4 °C. Um Verdunstungen zu vermeiden, wurde die Platte in Folie gewickelt. Nach der Inkubation wurde die Coating-Lösung aus der Platte ausgeklopft, danach wurde sie für vier Minuten mit 100 µl Pufferlösung (Puffer A) pro Loch bei 600 Upm auf einem Mikrotiterplattenschüttler gewaschen, um ungebundene Antikörper zu entfernen. Dieser Waschvorgang wurde insgesamt drei Mal durchgeführt und die Pufferlösung zwischendurch jeweils ausgeklopft.

40 µl der Urinproben wurden nun mit Puffer A verdünnt und zwar je nach der zu erwartenden Albuminkonzentration auf 1:50, 1:500, 1:5000 und 1:20.000.

Pro Loch wurden dann 50 µl Puffer A als Leerwert und 50 µl Standard- bzw. Urinprobenverdünnungen jeweils als Doppelbestimmung in die Platte pipettiert.

Es folgte die Zugabe von 50 µl Rattenantikörper pro Loch, welches den zweiten Antikörper im ELISA enthält. Die Mikrotiterplatte wurde dann eine Stunde bei 37 °C inkubiert.

Danach musste der Inhalt der Platte erneut ausgeklopft und die Platte wie zuvor beschrieben vier Minuten mit Puffer A gewaschen werden, dieses Mal erfolgten vier Waschvorgänge.

Für die Farbreaktion wurden 200 µl Substratlösung pro Loch in die Platte gegeben. Die Mikrotiterplatte wurde dann für 15 Minuten auf dem Mikrotiterplattenschüttler bei 600 Upm geschüttelt. Durch 50 µl Schwefelsäure pro Loch konnte die Farbreaktion gestoppt werden. Die Farbreaktion, bei der ein blauer Farbkomplex entsteht, ist invers, das heißt, eine geringere Blaufärbung zeigt höhere Albuminwerte und eine stärkere Blaufärbung niedrigere Albuminwerte. Nun erfolgte die photometrische Messung der optischen Dichte mittels eines ELISA-MRX-Plate-Readers bei 450 nm.

Für die Bestimmung des Albumins musste eine Eichgerade erstellt werden. Hierzu wurden 100 µl Rattenserum-Albumin-Stammlösung (1 mg/ml), mit 100 ml Puffer A verdünnt. Daraus wurden folgende Standardkonzentrationen jeweils in mg/l angesetzt: 0,00; 0,03; 0,05; 0,07; 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,6; 0,8 und 1 mg/l. Lagen die Werte der Extinktion der Proben nicht mittig auf der Kalibriergeraden, musste eine entsprechend andere Verdünnung gewählt werden (s.o.).

Die Erstellung der Eichgeraden, das Ablesen der Extinktion und der Ausdruck der Endwerte in mg/l erfolgten mit Hilfe des Computers. Zum Schluss wurde aus den Werten in g/l durch Beziehung der Urinproben auf die Verdünnung und auf das tägliche Urinvolumen die Albuminausscheidung in mg pro 24 Stunden berechnet.

#### **2.2.4. Tötung der Versuchstiere und Organentnahme**

Am Ende der vierten postoperativen Woche wurden die Tiere aus dem FEM in die Räume der klinischen Pharmakologie gebracht. Sie wurden aus ihren Gemeinschaftskäfigen in Einzelkäfige umgesetzt, gewogen und der Allgemeinzustand jedes der Tieres wurde eingeschätzt. Die Tiere wurden auf die gleiche Weise, wie zur Operation beschrieben, narkotisiert. Das weitere Vorgehen entsprach bis auf Desinfektion und Rasur ebenfalls dem in 2.2.1.3 beschriebenen.

Die Tötung erfolgte, nach einer für eine andere Studie vorgenommenen Herzkatheteruntersuchung, durch Exsanguierung über eine im linken Ventrikel befindliche Braunüle.

Ein bis drei Milliliter Blut wurden dabei in Eppendorf-Röhrchen aufgefangen um Serum zu gewinnen. Durch 15-minütiges Zentrifugieren bei 8000 U/min und 4 °C (Eppendorf, Zentrifuge 5417 R) wurde das Serum von korpuskulären Bestandteilen getrennt, abpipettiert und in 2 ml-Eppendorf-Röhrchen schockgefroren.

Sofort nach dem Ausbluten erfolgte die Sektion mit Organentnahme. Das Abdomen sowie der Thorax wurden großflächig eröffnet. Herz, Lunge, Leber und Niere wurden makroskopisch begutachtet. Bei den Tieren mit Nx wurde der Anteil des vorhandenen Nierengewebes beurteilt, um die Reduktion um 5/6 des Nierengewebes zu kontrollieren.

Den Tieren wurden die Nieren und linken Ventrikel entnommen:

##### **1. Herz:**

Nach Entfernung der großen Gefäße wurde das Herz gewogen. Der rechte Ventrikel wurde septumnah vom linken Ventrikel abgetrennt und in einem 2 ml Eppendorf-Röhrchen in flüssigem Stickstoff schockgefroren.

Der linke Ventrikel mit Septum interventrikulare wurde erneut gewogen. Es wurde die Herzspitze abgetrennt, dann eine Scheibe aus der Herzmitte herausgetrennt und in Duboscq-Brasil-Lösung für die anschließende histologische Beurteilung fixiert. Die Herzspitze und der Rest des Organs wurden ebenfalls schockgefroren.

##### **2. Niere:**

Die linke Niere wurde aus ihrer Kapsel gelöst. Gefäße und Ureter wurden aus dem Hilum entfernt. Das Ausmaß der Nekrose wurde bestimmt und notiert. Dabei gingen die Tiere nur in die Untersuchungen ein, wenn ca. 5/6 des Nierengewebes makroskopisch als nekrotisch erkennbar waren.

Ein kleiner Teil des verbleibenden funktionstüchtigen Nierengewebes wurde abgetrennt und in Methacarn-Lösung fixiert, um die histologische Begutachtung durchführen zu können. Der Organrest wurde wiederum schockgefroren.

Die Lagerung der Organproben und des Serums erfolgte in 2 ml Eppendorf-Röhrchen bei -81 ° C in den Räumen der klinischen Pharmakologie, Campus Benjamin Franklin.

Die Tierkadaver wurden separat gesammelt und durch die Tierkörperbeseitigung entsorgt

## **2.2.5. Histologie**

### **2.2.5.1. Paraffineinbettung der Organe**

Die in 80%igem Ethanol aufbewahrten Organe wurden in Histologie-Kassetten umgelagert. Die Entwässerung und Paraffineinbettung erfolgte in einem Histokinetteautomaten nach dem Tauchprinzip. Hierbei wurden die Präparate in aufsteigender Alkoholreihe 2 Stunden in 90%igem, 4 Stunden in 100%igem Ethanol und 2 Stunden in Isopropylalkohol entwässert. Anschließend wurde 6 Stunden in Intermedium und 3 Stunden in einem Wärmepf mit einem Gemisch aus Intermedium und Paraffin im Verhältnis 1:1 der Alkohol entfernt. Im letzten Schritt dieser Einbettung kamen die Kassetten in einen Wärmepf aus reinem Paraffin.

### **2.2.5.2. Schneiden und Färben der Organe**

Um die Organe schneiden zu können, mussten sie in dafür geeignete Einbettungsringe mit reinem Paraffin umgelagert werden. Dies erfolgte mit einer Einbettvorrichtung. Um bei den Nieren eine optimale Oberfläche zwischen oberem Nierenpol und Hilus zu erhalten, wurde die transversale Ebene gewählt. So ist sichergestellt, dass sowohl superfizielle als auch juxtamedulläre Glomeruli im Präparat vorhanden sind. Bei den Herzen wurde ebenfalls die transversale Schnittebene gewählt um eine repräsentative und vergleichbare Schicht für die Schnitte zu erhalten.

Die Schnittdicke beträgt 5µm und wurde mit einem Rotationsmikrotom der Firma Microm durchgeführt. Danach sind jeweils 10 Schnitte auf Objektträger übertragen worden, 1 Objektträger pro Herz für die Sirius-Rot-Färbung und 2 Objektträger pro Niere für Sirius-Rot- und PAS-Färbung.

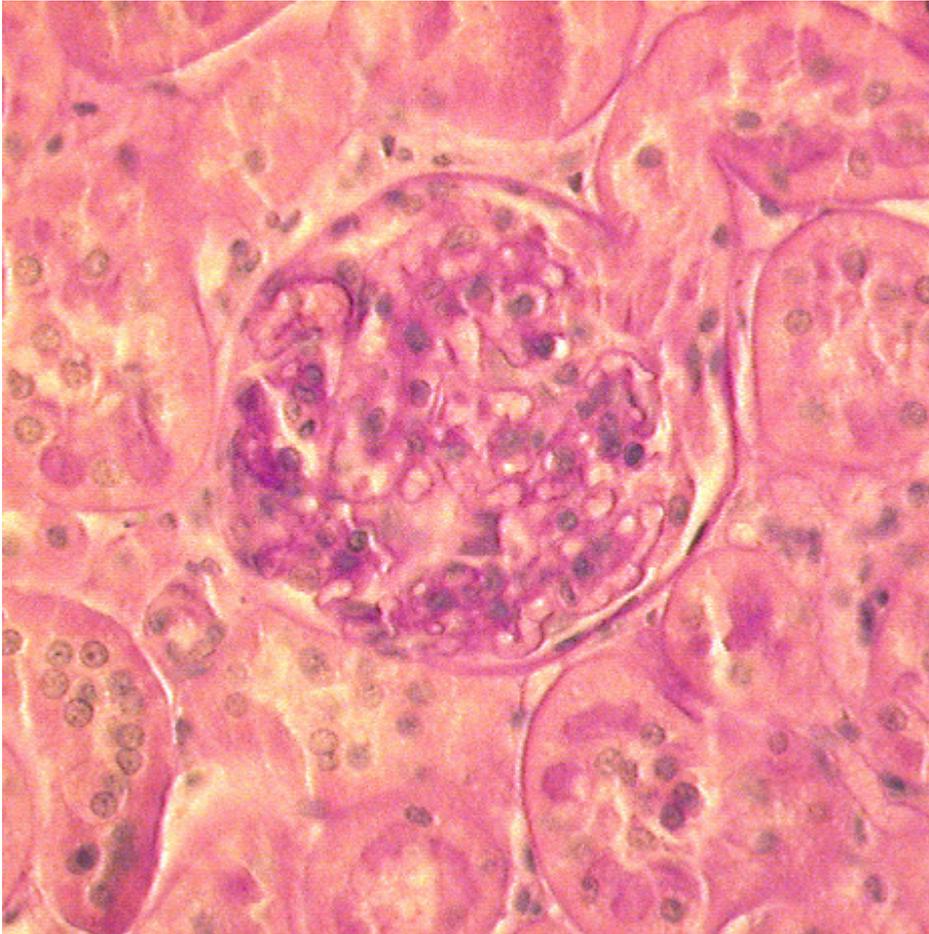
Nachdem die Objektträger auf einer mit 38°C eingestellten Wärmeplatte getrocknet waren, erfolgte die Färbung nach Sirius-Rot und PAS in einem Färbeautomat der Firma Microm. Die Färbeschritte wurden wie folgt durchgeführt:

- a) Sirius Rot: HistoClear für 30 min, absteigende Alkoholreihe; 100%iger Alkohol für 5 min, 90%iger Alkohol für 5 min, 80%iger Alkohol für 5 min, 70%iger Alkohol für 5 min, spülen in H<sub>2</sub>O für 3 min, Aqua dest. für 2 min, Sirius-Rot F3BA für 60 min, 0,01 N HCL für 4 min, aufsteigende Alkoholreihe; 70%iger Alkohol für 3 min, 90%iger Alkohol für 3 min, 95%iger Alkohol für 5 min, 95%iger Alkohol für 5 min, 100%iger Alkohol für 5 min, 100%iger Alkohol für 5 min, HistoClear für 30 min.
- b) PAS: HistoClear für 30 min, absteigende Alkoholreihe; 100%iger Alkohol für 5 min, 90%iger Alkohol für 5 min, 80%iger Alkohol für 5 min, 70%iger Alkohol für 5 min, spülen in H<sub>2</sub>O für 3 min, Aqua dest. für 2 min, 0,8%ige wässrige Perjodsäure für 15 min, spülen in H<sub>2</sub>O für 4 min, Aqua dest. für 1 min, Schiff'sreagens für 15 min, SO<sub>2</sub> (300ml Aqua dest., 15ml N HCL und 18ml einer 10%igen wässrigen Lösung von Natriumdisulfit) für 3 min, SO<sub>2</sub> für 3 min, spülen in H<sub>2</sub>O für 5 min, aufsteigende Alkoholreihe; 90%iger Alkohol für 4 min, 95%iger Alkohol für 5 min, 95%iger Alkohol für 5 min, 100%iger Alkohol für 5 min, 100%iger Alkohol für 5 min, HistoClear für 30 min.

## **2.2.6. Semiquantitative Bewertung und morphometrische Bildanalyse**

### **2.2.6.1. Semiquantitative Bewertung der Glomerulosklerose in der Niere**

Für die Bewertung der Glomerulosklerose wurden die Schnitte geblindet, in einem ersten Durchgang gesichtet und in einem zweiten Durchgang befundet. Darüber hinaus wurde eine zeitliche Vorgabe von 4 Wochen definiert, innerhalb derer die Glomeruli kontinuierlich bewertet werden mussten. Als Untersuchungsgerät diente das Photomikroskop Axiophot der Firma Carl Zeiss. Für alle Präparate wurden die gleichen Einstellungen am Mikroskop vorgenommen. Untersuchungsmaterial war der beste von 8 Schnitten auf einem Objektträger. Für den GSI wurden 40 Glomeruli, superfizielle und juxtamedulläre, in der PAS- Färbung in 200facher Vergrößerung nach einem Score von 0 bis 4 bewertet (nach Raj et al.1984<sup>85</sup>).



**Abbildung 7: Glomerulus in der PAS-Färbung.**

Schädigungsparameter bei der semiquantitativen Bewertung der Glomeruli war die Ablagerung von PAS-positivem Material in das Mesangium und um die Kapillarschlingen, segmental oder diffus, ohne oder mit Verlegung des extrakapillären Raumes, wobei

- 0 keine Veränderungen,
- 0,5 Veränderungen, die weniger als 12 % betreffen,
- 1 Veränderungen zwischen 12 und 25 %,
- 1,5 Veränderungen zwischen 25 und 37 %,
- 2 Veränderungen zwischen 37 und 50 %,
- 2,5 Veränderungen zwischen 50 und 62 %,
- 3 Veränderungen zwischen 62 und 75 %,
- 3,5 Veränderungen zwischen 75 und 90 % und
- 4 Veränderungen, die mehr als 90 % der Untersuchungsprobe betreffen.

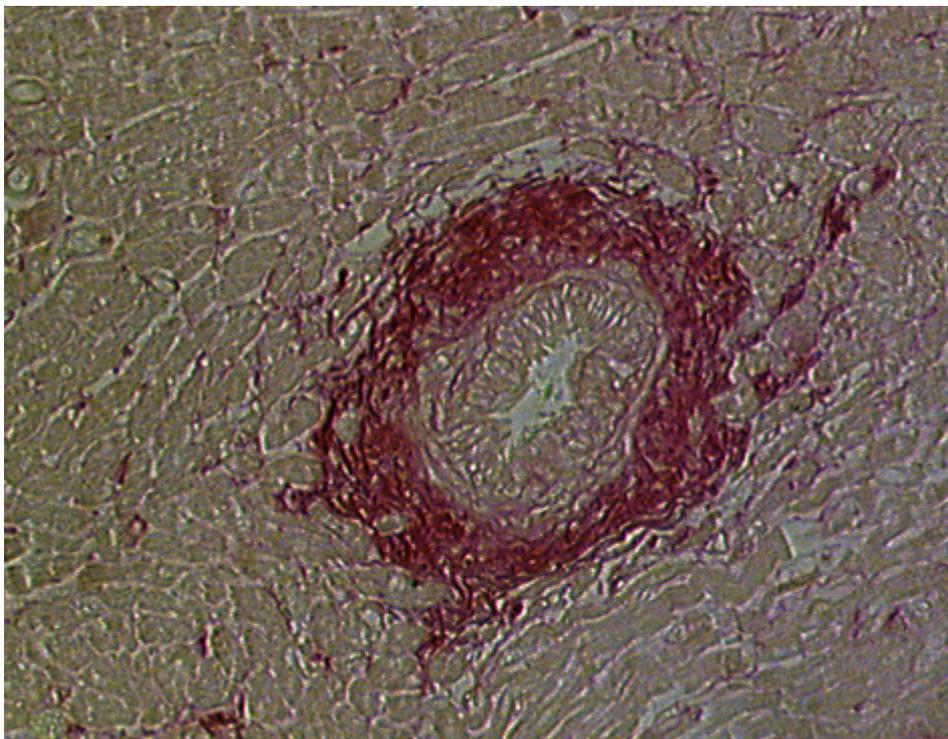
Die Einteilung der Bewertungsskala in 0,5-Abständen diente einer feinen Differenzierung zwischen den Schäden der einzelnen Glomeruli. Es wurde ein kumulativer Index gebildet und der Mittelwert berechnet. Zusätzliche Schädigungsparameter wie die Hyperzellularität, die Dicke

der Bowman'schen-Kapsel und die Größe der glomerulären Fläche im Nierenschnitt kennzeichnen das Gesamtausmaß der histopathologischen Veränderung des Glomerulus.

### **2.2.6.2. Morphometrische Bildanalyse der interstitiellen und der perivaskulären Fibrose des Herzens**

Die computergestützte Auswertung der kardialen Fibrose erfolgte an gleichmäßig über den mit Sirius-Rot gefärbten Schnitt verteilten Bildausschnitten. Die Sirius-Rot-Färbung ist spezifisch für Gesamtkollagen und detektiert damit das Ausmaß der interstitiellen Fibrose des Herzens.

Für die Quantifizierung der interstitiellen Fibrose wurden im Durchlicht 10 unterschiedliche Bildausschnitte ohne Gefäßanschnitte bei 100-facher Vergrößerung mit jeweils einer metrischen Flächengröße von 301146,94  $\mu\text{m}^2$  aufgenommen. Die Quantifizierung der perivaskulären Fibrose erfolgte anhand von jeweils 4 Bildausschnitten bei ebenfalls 100-facher Vergrößerung mit einer metrischen Flächengröße von 24575,48  $\mu\text{m}^2$ , wobei jeweils die linke untere Ecke des quadratischen Messfensters bündig mit der Intima angelegt wurde und das Messfenster somit den rechten oberen Ausschnitt der Gefäßwand und des perivaskulären Gewebes umfasste. Des Weiteren wurde das jeweilige Lumen des Gefäßes ausgemessen und mit der gemessenen Fibrosierung verrechnet. Somit konnte eine Vergleichbarkeit der Messungen erreicht werden.



**Abbildung 8: perivaskuläre Fibrose in der Sirius-Rot-Färbung**

Für die Aufnahme der Bilder wurde das Photomikroskop Axiophot der Firma Carl Zeiss, Oberkochen, verwendet, welches mit einem Videosystem der Firma AVT-HORN verbunden

war. Dieses Videosystem beinhaltet eine Farb-Videokamera mit drei 1/2"-CCD-Chips, ein externes Kamerasteuergerät und einen Frame Grabber. Um von dem angegebenen Bereich in der Niere digitale Bilder zu erhalten, wurde die Farb-Videokamera mit dem externen Kamerasteuergerät an einen Computer, Power Macintosh 8200/120, und den Frame Grabber angeschlossen. Alle Bilder wurden nach einer Aufwärmzeit der Bildanalyseeinheit von 10 Minuten mit den gleichen Einstellungen am Mikroskop und an der Kamera digitalisiert, im Tagged Image File Format (TIFF) gespeichert, eine Sicherungskopie auf einer beschreibbaren CD vorgenommen und mit dem Freeware-Programm Scion Image 1.62a ausgewertet. Für die Messung der gefärbten Flächen wurde die Bildanalyseeinheit zunächst mit einem Objektmikrometer auf metrische Einheiten kalibriert. Die Software wandelt das Bild auf der Grundlage von Grauwerten in schwarze und weiße Bereiche um. Die schwarzen Areale entsprechen dem mit Sirius-Rot gefärbten Gesamtkollagen, der weiße Hintergrund dem nicht mit Sirius-Rot gefärbten Gewebe. Der Schwellenwert für die Detektierung der fibrotischen Areale wird automatisch gesetzt und nach Vergleich mit dem Farbbild gegebenenfalls neu eingestellt. Die schwarzen Areale werden gemessen und als prozentualer Anteil vom Gesamtbild angegeben. Die Auswertung der Bilddaten konnte durch die im Bildanalyseprogramm integrierte Makrosprache Pascal weitgehend automatisiert werden, wobei das Prinzip dieser Bildanalyse als halbautomatisiertes Verfahren einzustufen ist. Von allen ausgemessenen Bildausschnitten pro Schnitt wurde ein Mittelwert gebildet.

### **2.2.7. Statistische Analyse**

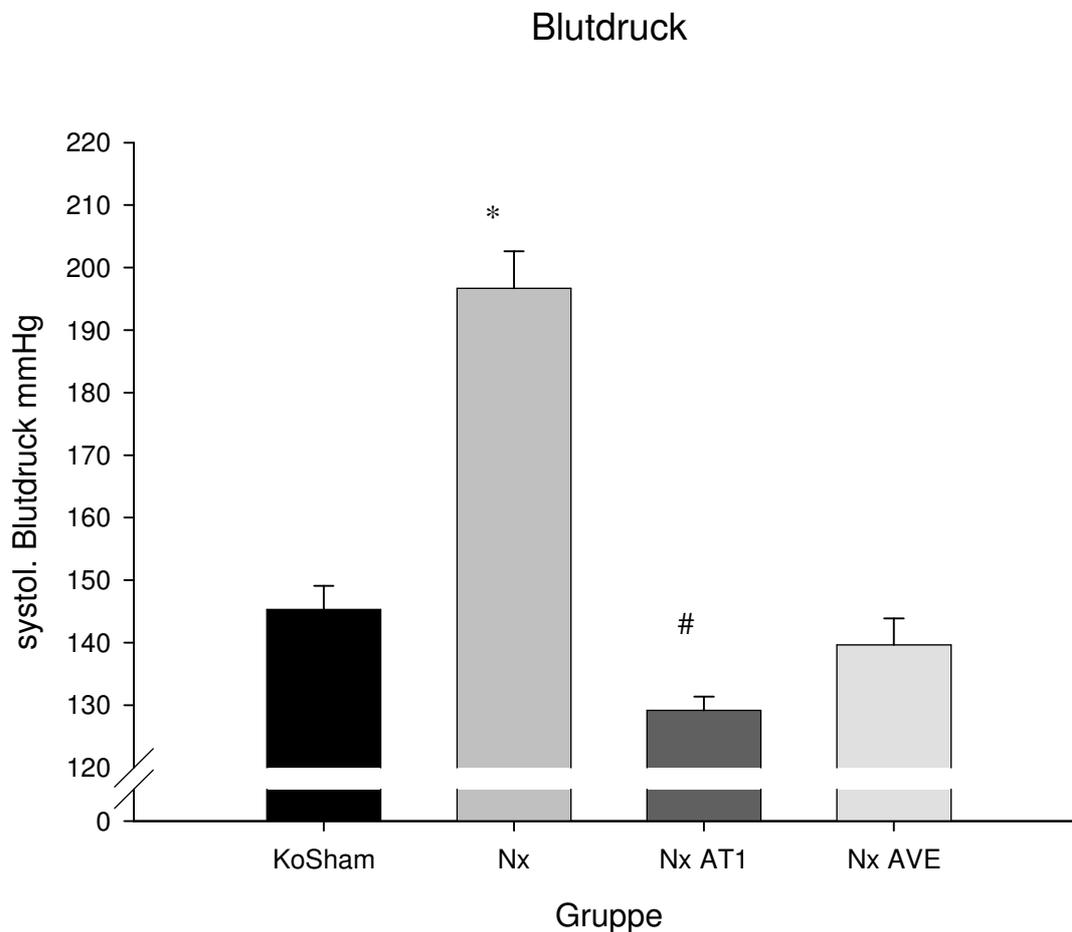
Die Auswertung der erhobenen Daten erfolgte unter Zuhilfenahme des Statistikprogrammes SPSS 11.5 für Windows der Firma SPSS Inc. 1981-2001. Alle Werte werden als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung des Mittelwertes (  $\text{mean} \pm \text{SEM}$  ) angegeben. Die statistische Analyse erfolgte durch nicht-parametrische Testung nach Mann-Whitney mit anschließender Adjustierung nach Bonferroni zur Berücksichtigung der alpha-Fehler-Kumulierung. Unterschiede wurden bei einem  $p < 0,05$  als signifikant angenommen.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1. Blutdruck

Abbildung 9 zeigt die gemessenen systolischen Blutdruckwerte am Ende der vierten postoperativen Woche. Es zeigt sich bei den nephrektomierten, unbehandelten Tieren der Gruppe Nx ein um durchschnittlich 51 mmHg höherer Blutdruck als bei den sham-operierten Ratten der Kontrollgruppe Ko Sham.

In beiden therapierten Gruppen ist der Blutdruck deutlich niedriger als in der Gruppe Nx und entspricht den Werten der scheinoperierten Tiere der Gruppe Ko Sham.



\*  $p < 0,05$  vs. Ko Sham

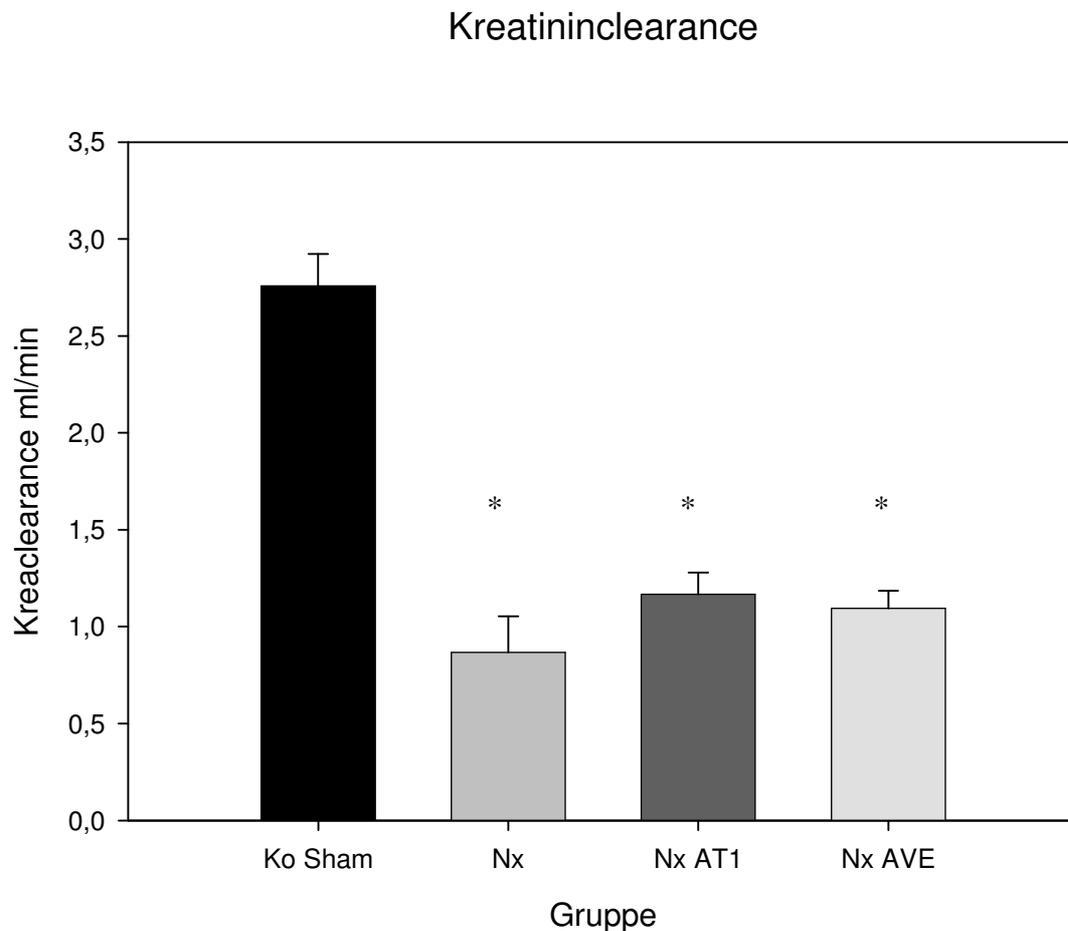
#  $p < 0,05$  vs. Nx

**Abbildung 9:** Systolischer Blutdruck am Ende der vierten Untersuchungswoche; Ko Sham = sham operierte Kontrollgruppe; Nx = 5/6 nephrektomiert und unbehandelt; Nx AT1 = 5/6 nephrektomiert + AT1-Antagonist; Nx AVE = 5/6 nephrektomiert + Vasopeptitaseinhibition.

### 3.2. Kreatininclearance

Die Kreatininclearance wird in Abbildung 10 dargestellt. Es zeigt sich in allen nephrektomierten Gruppen eine stark erniedrigte Kreatininclearance im Vergleich zu den sham-operierten Tieren der Gruppe Ko Sham. Die Kreatininclearance der unbehandelten nephrektomierten Tiere sank um 69%, die der Gruppe AT1 um 58% und die der Gruppe AVE um 61%.

Die Therapie mit AT1-Antagonisten zeigte ebenso keine Änderung der Clearance bezogen auf die unbehandelte Gruppe Nx wie die Therapie mit AVE.



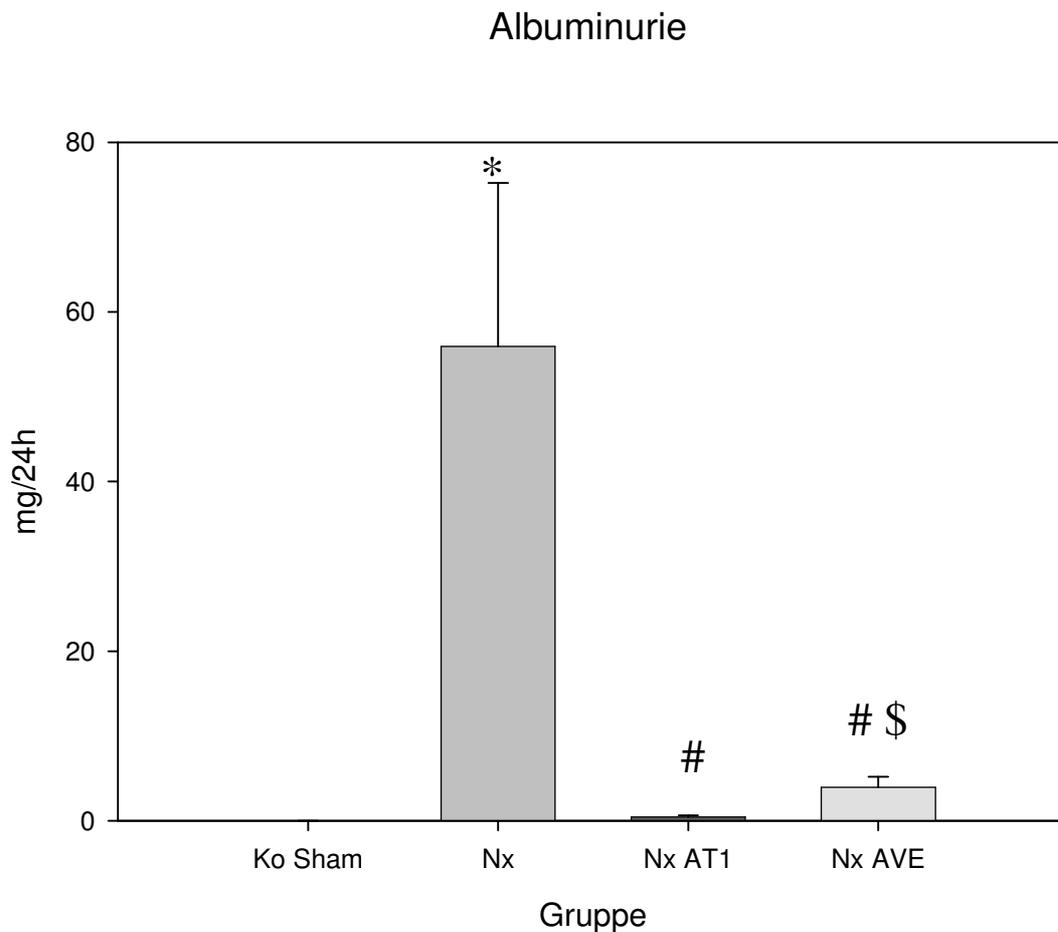
\*  $p < 0,05$  vs. Ko Sham

**Abbildung 10: Kreatininclearance am Ende der vierten Untersuchungswoche; Ko Sham = sham operierte Kontrollgruppe; Nx = 5/6 nephrektomiert und unbehandelt; Nx AT1 = 5/6 nephrektomiert + AT1-Antagonist; Nx AVE = 5/6 nephrektomiert + Vasopeptidaseinhibition.**

### 3.3. Albuminurie

Abbildung 11 zeigt die Albuminurie in der vierten postoperativen Woche.

Im Gegensatz zu Gruppe Ko Sham, die eine kaum nachweisbare Albuminurie aufweist, zeigt sich nach 5/6-Nephrektomie eine Steigerung auf durchschnittlich 55,9 mg/24h. Die Therapie mit dem Vasopeptidaseinhibitor verringert diesen Wert um 93%, der AT1-Antagonist bewirkt eine Verringerung um 99% (0,47 mg/24h).



\*  $p < 0,05$  vs. Ko Sham

#  $p < 0,05$  vs. Nx

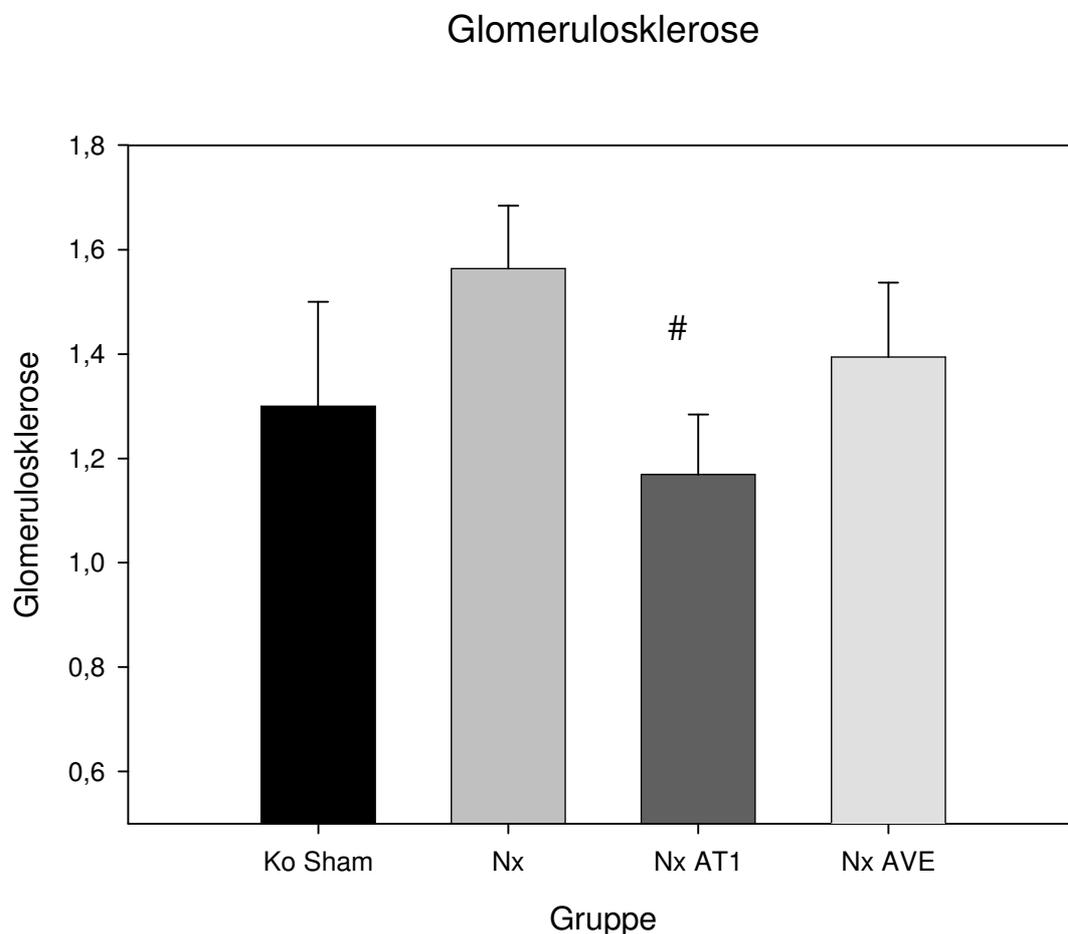
\$  $p < 0,05$  vs. Nx AT1

**Abbildung 11: Albuminurie am Ende der vierten Untersuchungswoche; Ko Sham = sham operierte Kontrollgruppe; Nx = 5/6 nephrektomiert und unbehandelt; Nx AT1 = 5/6 nephrektomiert + AT1-Antagonist; Nx AVE = 5/6 nephrektomiert + Vasopeptidaseinhibition.**

### 3.4. Glomerulosklerose

Abbildung 12 zeigt den Glomeruloskleroseindex (GSI). Eine Änderung der Glomerulosklerose bei den unbehandelten nephrektomierten Tieren im Vergleich zu den sham-operierten Tieren liegt nicht vor.

Bei Therapie mit AT1-Antagonisten zeigt sich eine signifikante Erniedrigung der Glomerulosklerose im Vergleich zu den unbehandelten nephrektomierten Tieren der Gruppe Nx. Der Vasopeptidaseinhibitor AVE führt zu keiner eindeutigen Veränderung im Vergleich zu den anderen drei Gruppen.



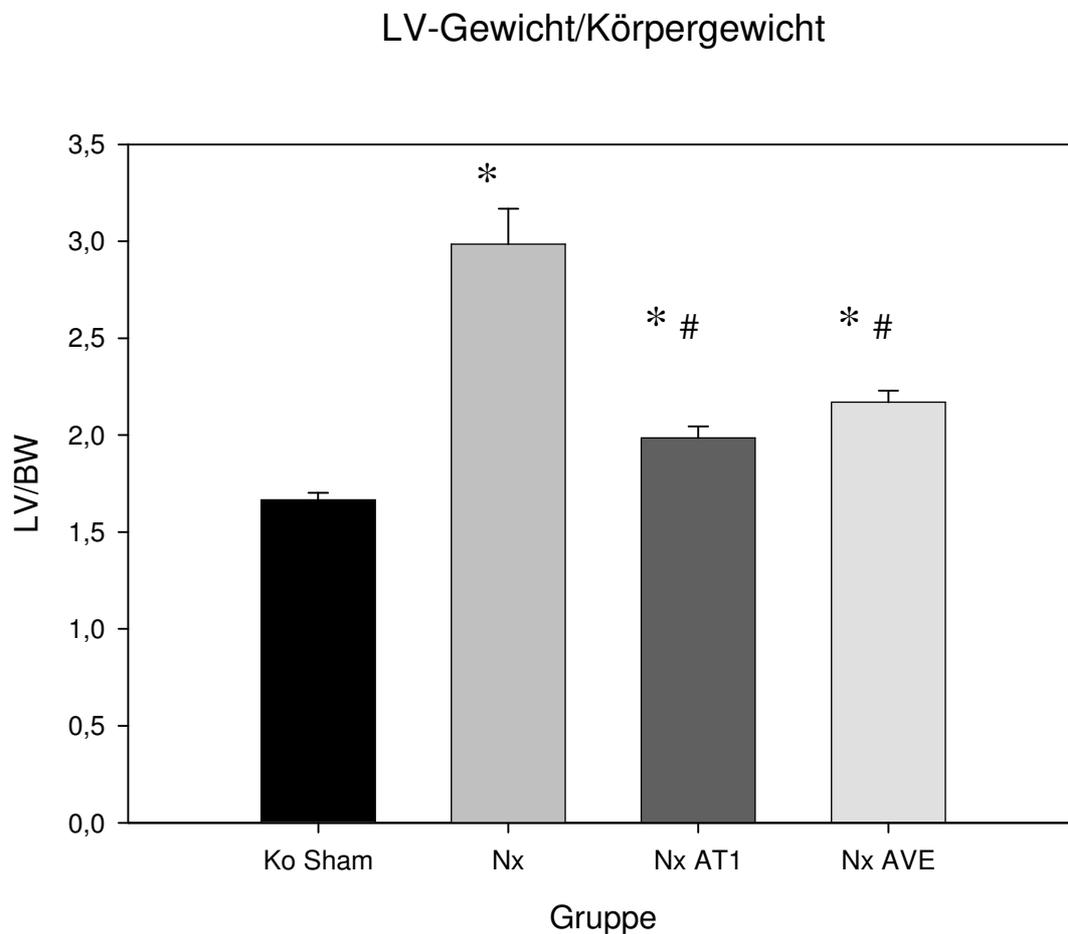
#  $p < 0,05$  vs. Nx

**Abbildung 12: semiquantitativ bestimmte Glomerulosklerose; Ko Sham = sham operierte Kontrollgruppe; Nx = 5/6 nephrektomiert und unbehandelt; Nx AT1 = 5/6 nephrektomiert + AT1-Antagonist; Nx AVE = 5/6 nephrektomiert + Vasopeptidaseinhibition.**

### 3.5. Linksventrikuläres Gewicht/Körpergewicht

Aus Abbildung 13 ist das linksventrikuläre Gewicht, normalisiert nach dem Körpergewicht, ersichtlich. Bei den nephrektomierten, unbehandelten Tieren der Gruppe Nx ist eine Steigerung des linksventrikulären Gewichtes um 58% im Vergleich zu den sham-operierten Tieren der Gruppe Ko Sham nachweisbar.

Unter Therapie mit AT1-Antagonisten sowie unter Vasopeptidase-Inhibitor-Therapie bleibt das linksventrikuläre Gewicht deutlich niedriger als ohne Therapie, es ist um 10 bzw. 13% erhöht im Vergleich zur Gruppe Ko Sham.



\*  $p < 0,05$  vs. Ko Sham

#  $p < 0,05$  vs. Nx

**Abbildung 13: Linksventrikuläres Gewicht nach dem Körpergewicht normalisiert; Ko Sham = sham operierte Kontrollgruppe; Nx = 5/6 nephrektomiert und unbehandelt; Nx AT1 = 5/6 nephrektomiert + AT1-Antagonist; Nx AVE = 5/6 nephrektomiert + Vasopeptidaseinhibition.**

### 3.6. *Interstitielle Fibrose*

Die interstitielle kardiale Fibrose ist in

Tabelle 2 aufgeführt. Ein signifikanter Unterschied zwischen den Untersuchungsgruppen lässt sich nicht feststellen.

Interstitielle Fibrose	
Gruppe	Mittelwert
Ko Sham	1,52 ± 0,43
Nx	1,03 ± 0,17
Nx AT1	1,02 ± 0,12
Nx AVE	1,47 ± 0,10

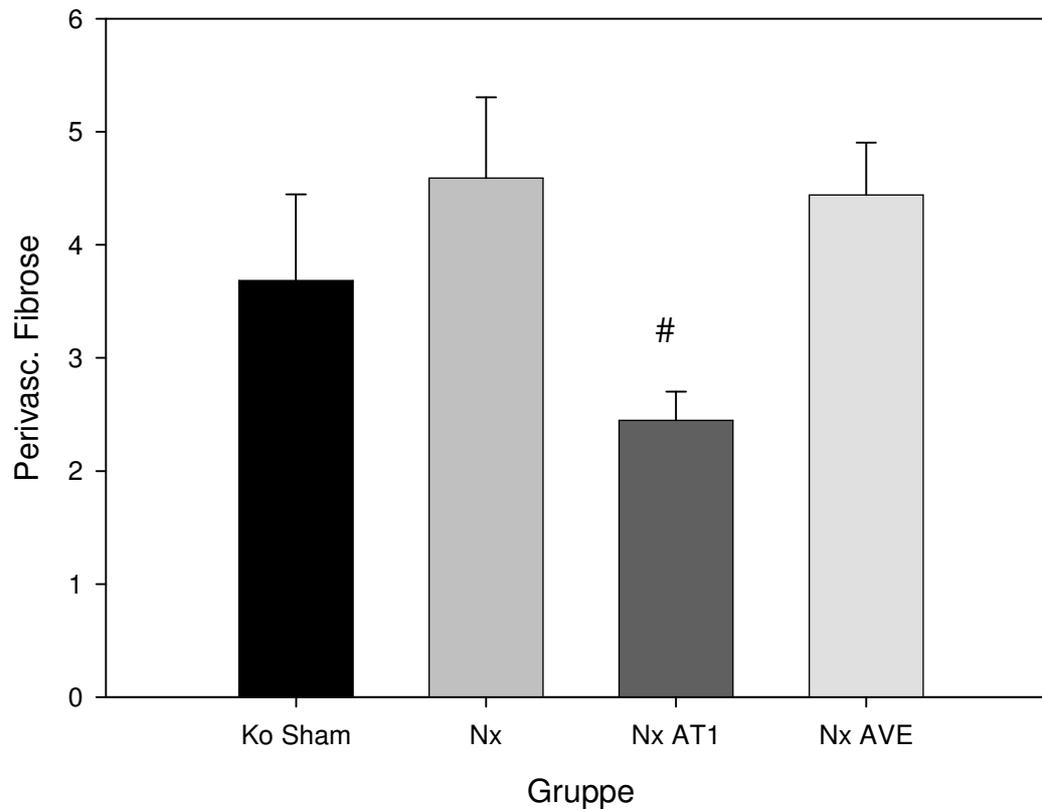
**Tabelle 2: Morphometrisch bestimmte interstitielle kardiale Fibrose; Ko Sham = sham operierte Kontrollgruppe; Nx = 5/6 nephrektomiert und unbehandelt; AT1 = 5/6 nephrektomiert + AT1-Antagonist; AVE = 5/6 nephrektomiert + Vasopeptidaseinhibition.**

### 3.7. *Perivaskuläre Fibrose*

Die perivaskuläre Fibrose als weiterer Parameter der kardialen Schädigung ist aus Abbildung 14 ersichtlich. Ein Unterschied zwischen unbehandelten nephrektomierten Tieren und den Tieren der Kontrollgruppe Ko Sham ist nicht nachweisbar.

Bei der Behandlung mit AT1-Antagonisten zeigt sich eine deutliche Erniedrigung der perivaskulären Fibrose im Vergleich mit der unbehandelten nephrektomierten Gruppe. Der Vasopeptidaseinhibitor zeigt keine Auswirkung.

## Perivaskuläre Fibrose



#  $p < 0,05$  vs. Nx

**Abbildung 14: Morphometrisch bestimmte perivaskuläre kardiale Fibrose; Ko Sham = sham operierte Kontrollgruppe; Nx = 5/6 nephrektomiert und unbehandelt; AT1 = 5/6 nephrektomiert + AT1-Antagonist; AVE = 5/6 nephrektomiert + Vasopeptitaseinhibition.**

## 4. Diskussion

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die protektive Wirkung einer Vasopeptidasehemmung auf renale und kardiale Endorganschäden im Niereninsuffizienzmodell mit verminderter Nephronenanzahl zu untersuchen.

Durch eine 5/6-Nephrektomie wird im Versuchsaufbau eine Niereninsuffizienz mit verminderter Nephronanzahl simuliert. Nach Brenner kommt es in den übrigen gesunden (bzw. bei durch Erkrankung nur teilweise geschädigten Nephronen) zu kompensatorischen Adaptationsvorgängen, die die Nierenfunktion stabilisieren<sup>4</sup>. Es kommt zu einer Hypertrophie der Nephrone, einer glomerulären Hyperperfusion und Hyperfiltration. Die Aktivierung des Renin-Angiotensin-Systems spielt bei diesen Vorgängen eine bedeutende Rolle<sup>86</sup>. Angiotensin II setzt kompensatorische Wachstumsprozesse der Nephrone in Gang, erhöht im Glomerulus den transkapillären Druck und trägt zur Hyperfiltration bei<sup>86</sup>. Auf Dauer ist dieser Mechanismus allerdings schädigend. Die gesteigerte glomeruläre Hämodynamik und die strukturellen Veränderungen bewirken eine Proteinurie. Die proinflammatorischen und profibrotischen Eigenschaften von Angiotensin II können zu einer glomerulären und tubulären Entzündung über Zytokin- und Chemokininduktion führen. Durch diese Mechanismen werden letztlich die Nephrone zerstört. Morphologisch ist dies an Glomerulosklerose, tubulointerstitieller Fibrose und Tubulusatrophie erkennbar.

In vergleichbaren Studien wurde von anderen Arbeitsgruppen meist ein ACE-Hemmer anstelle eines AT1-Antagonisten als Vergleichsmedikation eingesetzt. ACE metabolisiert zahlreiche Peptide, neben Angiotensin auch Kinine, chemotaktische Peptide, Enkepaline etc. ACE stellt den Hauptbildungsweg von Ang II dar und viele der positiven Effekte der ACE-Hemmung werden der Verminderung von Ang II zugeschrieben. Taal und Brenner 1999 sind in einem Studienrückblick zu der Überzeugung gekommen, dass die beiden Substanzgruppen ähnlich vorteilhafte Effekte am Rattenmodell einschließlich der Verbesserung von Proteinurie und Glomerulosklerose aufweisen<sup>87</sup>, sodass ein Vergleich der Arbeiten mit unseren Ergebnissen gerechtfertigt ist. Trotzdem gehen wir aufgrund dieser unspezifischen Wirkung der ACE-Hemmung davon aus, dass zur Beurteilung der Ang II-Wirkung eine selektive AT1-Rezeptorblockade überlegen ist und deshalb wurde diese in der vorgelegten Studie eingesetzt.

## **4.1. Blutdruck**

Der Blutdruck ist der am einfachsten messbare Parameter für kardiovaskuläre Veränderungen. Gleichzeitig wird er aber durch eine hohe Anzahl von Faktoren und Regelkreisläufen beeinflusst. In unseren Versuchen zeigte sich ein deutlicher Anstieg des systolischen Blutdruckes nach 5/6-Nephrektomie, wie er infolge der verminderten Nephronenzahl zu erwarten war. Bereits seit den 80er Jahren des 20. Jahrhunderts ist der Zusammenhang zwischen der Anzahl der Glomeruli und dem systolischen Blutdruck bekannt. Brenner et al. stellten in ihren Arbeiten ausführlich den Einfluss einer verminderten glomerulären Fläche auf den systemischen Blutdruck dar. Die Ursachen der verminderten Nephronenzahl spielen eine untergeordnete Rolle: es kann sowohl eine angeborene Oligonephronie, eine operative Reduktion der Nierenmasse als auch eine degenerative Glomerulosklerose vorliegen<sup>4,15,88</sup>.

In den übrigen gesunden bzw. nur teilweise geschädigten Nephronen kommt es zu kompensatorischen Adaptationsvorgängen, die die Nierenfunktion zunächst stabilisieren<sup>4</sup>. Hier spielt die Aktivierung des Renin-Angiotensin-Systems eine große Rolle. Diese Aktivierung vermittelt über die bewirkte Vasokonstriktion und profibrotische Effekte auch die Entstehung einer arteriellen Hypertonie. Die arterielle Hypertonie ist einer der wichtigsten Faktoren für das Fortschreiten von Nierenerkrankungen, indem sie additiv die Hyperfiltration verstärkt und die Filtrationsbarriere schädigt.

Durch die Gabe von AT1-Antagonisten wie auch von Vasopeptidaseinhibitoren konnte der Blutdruck vollständig kontrolliert werden. Diese Ergebnisse stimmen mit einer Reihe ähnlicher Untersuchungen überein und bestätigen diese (Tabelle 3). Lediglich in einzelnen Studien, vorzugsweise bei salzinduzierter Hypertonie, lässt sich keine blutdrucksenkende Wirkung des Vasopeptidaseinhibitors erkennen.

Prinzipiell ist ein direkter Vergleich eines AT1-Antagonisten mit einem Vasopeptidasehemmer wegen des Problems einer adäquaten Äquivalenzdosis immer nur eingeschränkt möglich. Die verbreitetste Methode ist es, die Äquivalenzdosis zweier antihypertensiv wirksamer Substanzen über die gleiche blutdrucksenkende Wirkung festzusetzen. In der vorgelegten Arbeit haben Olmesartan und Omapatrilat den gleichen blutdrucksenkenden Effekt und werden deshalb als dosisäquivalent angesehen.

Studienbeleg	Tierstamm	Modell	Behandlungsdauer	SBD ohne Therapie (mmHg)	SBD mit VPI (mmHg)
Abassi, Yahia et al. 2005 <sup>89</sup>	Wistar	Aortocavale Fistel	2 Wochen	90 +/- 9	71 +/- 6
Benigni, Zoja et al. 2004 <sup>7</sup>	Sprague-Dawley	5/6-Nx	70 Tage	159 +/- 5	105 +/- 5
Burrell, Droogh et al. 2000 <sup>90</sup>	SHR		10 Tage	237 +/-4	212 +/-4
Cao, Burrell et al. 2001 <sup>91</sup>	Sprague-Dawley	STNx	12 Wochen	174 +/- 9	L: 121 +/- 3 H: 110 +/- 3
Cheng, Grönholm et al. 2005 <sup>92</sup>	spontan diabetische Goto-Kakizaki (GK) Ratten	Salzreiche Diät	12 Wochen	Erhöht	Normalisiert
Davis, Johnston et al. 2003 <sup>93</sup>	Diabetische SHR		32 Wochen	185+/-2	L:148+/-2 H:133+/-2
Dong, Zhou et al. 2001 <sup>93</sup>	SHR		56 Tage		signifikant verminderter SBP und MBP
d'Uscio, Quaschnig et al. 2001 <sup>94</sup>	Dahl salz-sensitive Ratten	Salzreiche Diät	4 Wochen	200,1 +/-4,6	162,6+/-4,6
Ferrario, Averill et al. 2002 <sup>95</sup>	SHR		17 Tage	190+/-3	122+/-5
Fredersdorf, Weil et al. 2007 <sup>96</sup>	Zucker diabetic fatty rats		10 Wochen	129,3	99+/-2
Gröholm, Finckenberg et al. 2004 <sup>97</sup>	SHR		8 Wochen	~210	~175
Grönholm, Cheng et al. 2005 <sup>98</sup>	Goto-Kakizaki (GK) Ratte		12 Wochen		Enalapril und Omapatrilat senkten gleichermaßen den systolischen Blutdruck
Intengan, Schiffrin 2000 <sup>99</sup>	SPSHR		10 Wochen	230+/-2	145+/-3
Ishimura, Nishikimi et al. 2005 <sup>100</sup>	Dahl salz-resistente (DR) Ratte		7 Wochen		(-26 mmHg)
Krebs, Hamming et al. 2007 <sup>101</sup>	Goldblatt	two kidney-1-clip			Vasopeptidase-inhibitor erniedrigte dosisabhängig den Blutdruck
Lapointe, Nguyen et al. 2003 <sup>102</sup>	Sprague-Dawley rats	Myokardinfarkt	38 Tage	Small MI: 118+/-3 Large MI: 109+/-3	L: 100+/-4 H: 88+/-2 L:92+/-3 H:86+/-2
Lassila, Davis et al. 2003 <sup>103</sup>	Diabetische SHR		32 Wochen	200+/-5	176+/-2

Laverman, Van Goor et al. 2003 <sup>104</sup>	Wistar rats mit Adriamycin Nephrose	N: (0.05% NaCl) E: (3.0% NaCl) Salz-Diät	Bis zum Tod	N: -5+/-2% E: +1+/-4%	N: -29+/-2% E: -6+/-4%
Linz, Schäfer et al. 2006 <sup>105</sup>	SHR		6 Monate	~210	~150
Loch, Hoey et al. 2006 <sup>106</sup>	Wistar	uninephrectomized (UNX)	2 Wochen		Omapatrilat-Behandlung senkte nicht den systolischen Blutdruck
Maki, Nasa et al. 2003 <sup>107</sup>	Wistar	Herzinsuff. nach Ligatur der linken Koronararterie	5 Wochen	108+/-3	96+/-3
Mifsud, Burrell et al. 2004 <sup>108</sup>	hypertensive (mREN-2)7 Ratten		24 Wochen	178 +/- 3	L: 110 +/- 3 H: 91 +/- 3
Morazo, Fortepiani et al. 2001 <sup>109</sup>	SHR und normotensive WKY		15 Tage	SHR: 165,1+/-1,8 WKY: 124,5+/-2.8	SHR: 112,4 +/-2.7 WKY: 112,7+/-2,7
Nishikimi, Mori et al. 2006 <sup>110</sup>	Dahl salz-sensitive Ratten		7 Wochen	~240	~210
Pu, Schiffrin 2001 <sup>111</sup>	SPSHR; normotensive WKY Ratten		10 Wochen	~230	~150
Quaschnig, d'Uscio et al. 2001 <sup>112</sup>	Dahl salz-sensitive Ratten	standard oder salzreiches (4% NaCl) Futter	8 Wochen	196+/-6	162+/-5
Quaschnig, Hocher et al. 2006 <sup>113</sup>	WKY	two-kidney one-clamp	3 Wochen	208 +/- 19	119 +/- 8
Raasch, Dominiak et al. 2005 <sup>114</sup>					
Steinmetz, Sadaghiani et al. 2007 <sup>115</sup>	Sprague-Dawley	“two-kidney, one-clip hypertension” (Goldblatt)	6 Wochen	176+/-4	L: 168+/-8 M: 133+/-7 H: 94+/-4
Taal, Nenov et al. 2001 <sup>116</sup>	Munich-Wistar	5/6 Nx	4-6 Wochen	143 +/- 5	L: 93+/-3 H: 85+/-3
Wang, Takabatake 2005 <sup>117</sup>	SHR	anästhesiert	2 Stunden	150+/-2	114+/-3
Windt, Eijkelkamp et al. 2006 <sup>118</sup>	Wistar	unilaterale Nx und Myokardinfarkt	6 Wochen	137+/-3	-37 +/- 2%
Wong, Szeto et al. 2006 <sup>119</sup>	Zucker fatty rats		5 Tage	112+/-2.18	84.4+/- 7.52
Ye, Hodge et al. 2004 <sup>120</sup>	salz sensitive Hypertension	L-nitro-omega-methylarginin (L-NAME)	4 Wochen		BD-Senkung P<0.005
Ying, Flamant et al. 2003 <sup>121</sup>	Salt-loaded nitric oxide-deficient rats	Salzreiche Diät	4 Wochen	191+/-4	112+/-2

**Tabelle 3: Studien zur Wirkung von Vasopeptidaseinhibitoren bei Hypertonie (L=niedrig dosierte Therapie, H= hoch dosiert).**

Wir haben in unserer Arbeit auch den Einfluss des Blutdruckes auf die histologischen Veränderungen des Herzens und der Niere untersucht. Dabei zeigen sich signifikante Korrelationen zwischen dem systolischen Blutdruck und der interstitiellen (r = 0,530, P < 0,001) sowie der perivaskulären Fibrose des Herzens (r = 0,464, P < 0,004). Dies ist in einer Vielzahl anderer Arbeiten bereits belegt worden<sup>122,123</sup>. Interessant ist, dass eine Korrelation zwischen Blutdruck und Glomerulosklerose in der vorliegenden Arbeit nicht nachweisbar ist. Eine mögliche Ursache ist der relativ kurze Untersuchungszeitraum von vier Wochen. Wir gehen davon aus, dass bei längerer Versuchsdauer, wie in vielen Studien belegt, die Höhe des arteriellen Blutdruckes mit dem Ausmaß der Glomerulosklerose korreliert hätte. In dem untersuchten Wistar-Rattenstamm scheint die Suszeptibilität für kardiale Endorganschäden ausgeprägter als für renale Endorganschädigungen zu sein.

## **4.2. Nierenfunktionseinschränkung**

Infolge der operativen Entfernung von 5/6 der Nieren entsteht ein Verlust von 5/6 der Filtrationsfläche. Durch das akute Geschehen muss sich die Niere innerhalb kurzer Zeit an eine Verschlechterung der Situation anpassen. Somit stellt sich auch die Frage, wie die Niere ihre Filtrationsfähigkeit aufrechterhalten kann und ob diese von der Gabe eines Vasopeptidaseinhibitors oder AT1-Antagonisten beeinflusst wird.

### **4.2.1. Kreatininclearance**

In unseren Versuchen zeigte sich nach vierwöchiger Versuchszeit in allen nephrektomierten Gruppen eine deutliche Verschlechterung der Clearance infolge des drastischen Verlustes an funktionstüchtigem Nierengewebe. Ein Unterschied zwischen der therapierten und der nicht therapierten Gruppe ließ sich nicht feststellen.

Cao, Burrell et al.<sup>91</sup> untersuchten den Effekt von Omapatrilat bei subtotal nephrektomierten Ratten. STNx-Ratten wurden in vier Gruppen randomisiert und für 12 Wochen behandelt: keine Therapie, Omapatrilat in niedriger Dosierung von 10 mg/kg und in hoher Dosierung von 40 mg/kg, oder ein ACE Inhibitor, Fosinopril, in einer Dosierung von 10 mg/kg. Sham-operierte Ratten wurden als Kontrolltiere verwendet. GFR und Plasmaharnstoff und Kreatininkonzentration wurden durch Omapatrilat und Fosinopril in vergleichbarem Maße verbessert. Im Unterschied zu den Daten der vorgelegten Arbeit wurden die Tiere in der oben genannten Studie für zwölf Wochen behandelt. Die Kürze der Versuchsdauer in der vorgelegten Arbeit ist möglicherweise die Ursache dafür, dass Omapatrilat und Olmesartan noch keine nachweisbare Wirkung auf die Kreatininclearance haben. Die Dosierung des Omapatrilats war in

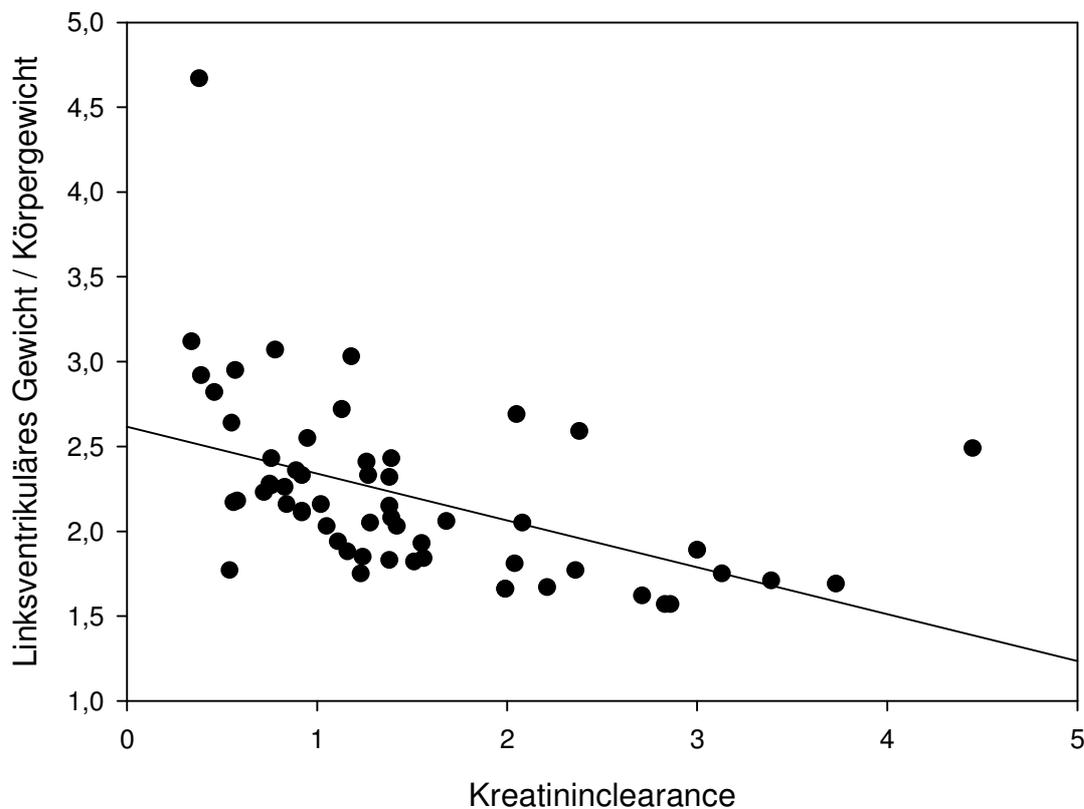
unserer Arbeit mit der von Cao et al. vergleichbar und kann daher nicht Grund für die fehlende nephroprotektive Wirkung sein.

Wang, Takabatake<sup>124</sup> befassten sich ebenfalls mit der Wirkung von Omapatrilat auf die renale Funktion. Diese wurde bei anästhesierten neun bis zehn Wochen alten spontan hypertensiven Ratten (SHR) bestimmt. Bei intravenöser Injektion war ein Abfall von Blutdruck und renalem vaskulärem Widerstand nachweisbar. Der renale Plasmafluss blieb unverändert, während die GFR und die Filtrationsfraktion reduziert waren.

Ob Omapatrilat einen anderen Effekt auf die renale und kardiovaskuläre Struktur hat als der ACE-Hemmer Enalapril untersuchten Wenzel, Wolf et al.<sup>125</sup>. Hypertensive “two-kidney, one clip”-Ratten wurden in vier Gruppen randomisiert und für weitere acht Wochen untersucht: keine Therapie, OMA, ENP oder ENP in Kombination mit dem Diuretikum Hydrochlorothiazid (ENP + HCTZ). Sie stellten fest, dass die antihypertensive Therapie die renale Funktion verringert, wie ein Anstieg des Plasmakreatinin und Harnstoff und ein Abfall der Kreatininclearance zeigen.

Ying, Flamant et al.<sup>121</sup> befassten sich mit den renalen Effekten von Omapatrilat und Captopril bei Ratten mit inhibierter NO-Synthase und Salz-Diät. Omapatrilat und Captopril bewirkten unabhängig von der Diät eine deutlich verringerte Mortalität, in der salzarmen Gruppe führten sie neben einer Normalisierung des Blutdruckes auch zu einer normalisierten Kreatininclearance. In den Gruppen mit salzreicher Diät blieb die Kreatininclearance niedriger als bei den Kontrolltieren.

Wie die oben erwähnten Studien zeigen, ist aktuell die Wirkung einer Vasopeptidasehemmung auf die Kreatininclearance als Marker für die Filtrationsleistung der Niere noch nicht abschließend geklärt. In jedem Falle ist es für zukünftige tierexperimentelle Studien essentiell, einen ausreichend langen Untersuchungszeitraum zu wählen (im Rattenmodell mindestens acht bis zwölf Wochen), um die spezifischen Effekte einer Vasopeptidasehemmung diskriminieren zu können.



**Abbildung 15: Korrelation zwischen der Kreatinin-clearance und dem relativen linksventrikulären Gewicht**  
 $r = 0,478$ ;  $P < 0,001$ .

#### 4.2.2. Albuminurie

Die Proteinurie zählt gemeinsam mit der arteriellen Hypertonie zu den wichtigsten Faktoren für das Fortschreiten von Nierenerkrankungen; ihre schädigende Wirkung verhält sich additiv. Eine Druckerhöhung in den Kapillaren der funktionsfähigen Glomeruli bewirkt einen zunehmenden Partikelflux über die Zellmembranen, der auch zum Übertritt von Proteinen ins Ultrafiltrat beiträgt. Somit begünstigt bereits eine glomeruläre Druckerhöhung eine Proteinurie.

In unseren Versuchen zeigte sich bei der nicht therapierten Gruppe Nx nach der 5/6-Nephrektomie ein drastischer Anstieg der Albuminurie auf durchschnittlich 56 mg/24h. Die Therapie mit dem Vasopeptidaseinhibitor verringert diesen Wert um über 90%, der AT1-Antagonist bewirkt eine noch deutlichere Verringerung. Somit konnten beide Medikamente das Auftreten einer Albuminurie nahezu verhindern.

Die frühere Annahme, dass die Proteinurie nur ein Marker der Nierenschädigung sei, ist der Vorstellung gewichen, dass sie selbst zu dem zunehmenden Funktionsverlust der Niere beitragen

kann<sup>40,126</sup>. Durch eine große Proteinurie wird unter anderem das Renin-Angiotensin-System und das Endothelin-System aktiviert, sie wirkt direkt tubulotoxisch und durch die Freisetzung von chemotaktischen Substanzen und profibrotischen Zytokinen kann es zu einer tubulointerstitiellen Entzündung mit anschließender Vernarbung kommen<sup>40,126</sup>. Dies lässt sich auch anhand des Zusammenhangs zwischen einer gesteigerten Albuminurie und einer verstärkten Glomerulosklerose erkennen.

In zahlreichen Studien wurde die Verhinderung bzw. Verminderung der Albuminurie/Proteinurie mittels ACE-Hemmer- oder Vasopeptidasehemmer-Therapie belegt (Tabelle 4). Die Ergebnisse der vorgelegten Arbeit hinsichtlich der positiven Wirkung auf die Proteinurie stimmen mit den Ergebnissen von vier anderen Studien an nephrektomierten Ratten überein (Benigni, Cao, Taal, Windt). Dabei scheint es sich um eine dosisabhängige Wirkung zu handeln. Zusammengefasst hat die Vasopeptidasehemmung hinsichtlich der Albuminurie/Proteinurie eine der AT1-Hemmung vergleichbare Wirkung.

Studien- beleg	Tierstamm/ Modell	Behandlungs- dauer	Bemer- kungen	Albuminurie	Albuminurie (mg/d)	
				(mg/d) Ohne Therapie	Mit Therapie	
					VPI	ACE/AT1
Benigni, Zoja et al. 2004 <sup>7</sup>	5/6 Nx	70 Tage		518 +/- 27	88 +/- 28	277 +/- 81
Cao, Burrell et al. 2001 <sup>91</sup>	STNx	12 Wochen		246 +/- 73	L: 30 +/- 4; H: 20 +/- 2	88 +/- 21
Davis, Johnston et al. 2003 <sup>93</sup>	Diabetische SHR	32 Wochen		145 x/÷1,1	L: ~60 H: ~30	97,1 x/÷ 1,1
Fredersdorf , Weil et al. 2007 <sup>96</sup>	Zucker diabetic fatty rats	10 Wochen		~60	~10	~45
Laverman, Van Goor et al. 2003 <sup>104</sup>	Wistar	Salzreiche Diät		+23 +/- 2%	-48 +/- 4%	-80 +/- 2%
Linz, Schäfer et al. 2006 <sup>105</sup>	SHR	6 Monate	Albumin- Kreatinin Ratio	107+/-54 µg/mg	22+/-12 µg/mg	57+/-34 µg/mg
Mifsud, Burrell et al. 2004 <sup>108</sup>	m(Ren-2)27	24 Wochen		9,2 x/÷1,4	L: 0,3 x/÷1,1 H: 0,2 x/÷1,1	0,6 x/÷1,3
Nakhoul, Ramadan et al. 2005 <sup>127</sup>	Adriamycin- induziertes Nephrotisches Syndrom	5 Wochen	Cumulative Proteinaus- scheidung	22,490 +/- 931 mg	18,706 +/- 1,042 mg	ENA:15,727 +/- 2,204 mg LOS: 20,351 +/- 1,360 mg
Schäfer, Linz et al. 2003 <sup>128</sup>	ZDF	37 Wochen		342+/-56 mg/kg/day	33+/-12 mg/kg/day	
Schäfer, Schmidts et al. 2004 <sup>129</sup>	übergewichtig e ZDF/Gmi- fa/fa-Ratte	26 Wochen		9,5+/-1.3 mg kg <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup>	1.1+/-0.1 mg kg <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup>	
Taal, Nenov et al. 2001 <sup>116</sup>	Munich- Wistar, 5/6 Nx	Vergleich nach 8Wochen		~84	~18	~24
Wihler, Schäfer et al. 2005 <sup>130</sup>	ZDF	27 Wochen		14,23+/-2,32 mg*kg <sup>-1</sup> *h <sup>-1</sup>	1,49+/-0,55 mg*kg <sup>-1</sup> *h <sup>-1</sup>	10,11+/-2,17 mg*kg <sup>-1</sup> *h <sup>-1</sup>
Windt, Eijkelkamp et al. 2006 <sup>118</sup>	unilateral Nx	6 Wochen		167 +/- 20 mg/d	77 +/- 4%	76 +/- 6
Ying, Flamant et al. 2003 <sup>121</sup>	salt-loaded, nitric oxide- deficient rats	4 Wochen		N: 58,1+/-13,5 H: 162+/-16,2	N: 33,1+/- 5,18 H: 87,6+/-12	N: 26,4+/- 2,11 H: 79,15+/- 9,06

**Tabelle 4: Studien zur Wirkung von VPI auf Albuminurie bei Ratten.**

~ = aus Graph abgelesener Wert; L = niedrig dosierte Therapie; H = hoch dosierte Therapie

### 4.3. *Glomerulosklerose*

Durch die Hyperfiltration und Hyperperfusion der restlichen funktionierenden Nephrone führt der gesteigerte intraglomeruläre Druck zu einer Vergrößerung der Glomeruli. Jedes einzelne Nephron wird durch eine erhöhte Ultrafiltration beansprucht. Es entwickelt sich eine Schädigung der Podozyten, gefolgt von Proteinurie, Ablagerung von Proteinen im Mesangium und schließlich einer irreversiblen Glomerulosklerose<sup>131</sup>. Diese initiale Anpassungssituation kann später zu glomerulärer Schädigung mit weiterem Nephronverlust führen und einen Teufelskreis auslösen.

Dieser Prozess stellt sich folgendermaßen dar: Der Hauptangriffsort glomerulärer Schädigung sind teilungsunfähige postmitotische Podozyten. Daher muss in großen bzw. hyperfiltrierten Glomeruli jeder einzelne Podozyt eine zunehmend größere Fläche der Basalmembran bedecken. Ab einer gewissen Fläche ist es dem Podozyten nicht mehr möglich, die Basalmembran komplett zu bedecken. Es bilden sich Synechien durch Verklebung der Basalmembran mit dem parietalen Blatt der Bowman Kapsel. Durch eine Schädigung glomerulärer Epithelzellen kommt es zudem zu einem Verlust elektrostatischer und mechanischer Schranken. Infolge der Unterbrechung dieser Schranken gelangen große Mengen an Plasmaproteinen in das Glomerulofiltrat; die Folge sind Proteinurie und Glomerulosklerose<sup>131</sup>.

In dem vorliegenden Versuch lag vier Wochen nach erfolgter 5/6-Nephrektomie bei den unbehandelten Tieren keine signifikante Zunahme der Glomerulosklerose vor. Der Effekt des Vasopeptidaseinhibitors sowie des AT1-Antagonisten war nicht signifikant.

In einem ähnlichen Versuchsaufbau beschäftigten sich Cao et al. mit der Wirkung der Vasopeptidaseinhibitoren. Sie teilten 5/6-nephrektomierte Ratten in vier Gruppen, die 12 Wochen lang folgendermaßen behandelt wurden: eine Gruppe unbehandelt, zwei Gruppen mit unterschiedlichen Dosen Omapatrilat (10 bzw. 40mg/kg) und eine weitere Gruppe, die mit dem ACE-Hemmer Fosinopril behandelt wurde. Als Vergleich dienten sham-operierte Ratten. Die Bestimmung der Glomerulosklerose erfolgte, wie in der vorliegenden Arbeit, semiquantitativ mittels eines Scores von Null bis Vier. Sowohl für den ACE-Hemmer als auch den Vasopeptidaseinhibitor konnte eine deutliche Verringerung der Glomerulosklerose in vergleichbarem Ausmaß nachgewiesen werden<sup>91</sup>.

Zu ähnlichen Ergebnissen kamen auch Taal et al. In unterschiedlichen Versuchsteilen wurden verschiedene Therapieschemata verfolgt, die sich nach der zum Blutdruckausgleich nötigen Dosis richteten. Gefragt war die nephroprotektive Wirkung des VPI im Vergleich zu dem ACE-Hemmer Enalapril. Nach dem Versuchszeitraum wurde der GS-Score berechnet, indem der Anteil der teilweise oder komplett sklerosierten Glomeruli an der Gesamtzahl in einem

festgelegten Schnitt sichtbarer Glomeruli bestimmt wurde. Bei einem Therapiebeginn unmittelbar nach 5/6-Nx zeigt sich bis zum Versuchsende nach 12 Wochen, dass sowohl Enalapril als auch Omapatrilat eine GS-Entwicklung verhindern. Wird die Therapie erst 4 Wochen nach Nx eingeleitet, kann Omapatrilat das Fortschreiten der GS deutlich stärker verlangsamen als Enalapril. Beide Substanzen haben das Potenzial, die bereits entstandene Glomerulosklerose zunächst zu verringern, gefolgt von einer, durch den VPI stärker als durch Enalapril, verlangsamten GS-Zunahme. Insgesamt zeigte sich hier vor allem ein besserer Langzeitschutz für die Niere durch den VPI im Sinne einer geringeren GS im Vergleich zu Enalapril<sup>116</sup>.

In ihrer 2004 veröffentlichten Studie verglichen Benigni et al. die Wirkung des Vasopeptidaseinhibitors AVE7688 mit Enalapril. Sie begannen die Therapie der 5/6-nephrektomierten Tiere 21 Tage nach Nx, nachdem sich ein Hypertonie und eine deutliche Proteinurie eingestellt hatten. Bei einer vergleichbaren Blutdruckkontrolle zeigte sich ein deutlicher Vorsprung des VPI bezüglich der Glomeruloskleroseverminderung<sup>7</sup>.

Weitere Studien zur Wirkung von VPI zeigt Tabelle 5.

Studienbeleg	Tierstamm/Modell	Behandlungsdauer	Scoringssystem	GS ohne Ther.	GS mit VPI
Davis, Johnston et al. 2003	Diabetische SHR	32 Wochen	GSI 0-4	3,4+/-0,8	L: 2,2+/-0,1 H:1,6+/-01
Laverman, Van Goor et al. 2003	Wistar mit Adriamycin Nephrose, Salzdiät	16 Wochen	Fokaler Glomerulosklerose e-Score (0-400)	79 +/- 27	38 +/- 14 (nicht signifikant)
Mifsud, Burrell et al. 2004	m(Ren-2)27	24 Wochen	GSI 0-4	1,7 +/-0,1	L: 0,4+/-0,1 H: 0,3+/-0,1
Schäfer, Linz et al. 2003	ZDF	27 Wochen	%	100%	13%
Schäfer, Schmidts et al. 2004	übergewichtige (ZDF/Gmifafa) Ratte	47 Wochen	GSI 0-4	~2,45	~0,8
Wenzel, Wolf et al. 2003	two-kidney, one clip hypertension	8 Wochen		0,59+/-0,17	0,07+/-0,01
Windt, Eijkelkamp et al. 2006	unilaterale Nephrectomie und myocardialer Infarkt	6 Wochen	Fokaler Glomerulosklerose e-Score (0-200)	~26	~13 (nicht signifikant)

**Tabelle 5: Studien zur Wirkung von VPI auf Glomeruloskleroseentwicklung.**

~ = aus Graph abgelesener Wert: L = niedrig dosierte Therapie: H = hoch dosierte Therapie

Zusammengefasst war in der vorgelegten Arbeit selbst in der unbehandelten Gruppe kein signifikanter Unterschied in der Glomerulosklerose erkennbar. Es bleibt zukünftigen Untersuchungen vorbehalten, einen längeren Versuchszeitraum (mindestens acht bis zwölf Wochen) zu untersuchen, um einen ausgeprägten Phänotyp nach 5/6-Nx und damit potentielle nephroprotektive Wirkung einer Vasopeptidasehemmung nachweisen zu können. In den anderen Studien waren vor allem nach längerem Versuchszeitraum deutliche Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen erkennbar (Davis, Mifsud, Schäfer, Wenzel). Dies ist durchaus nicht überraschend, da im Gegensatz zu den flexibleren Markern wie Blutdruck etc. die Glomerulosklerose das Ergebnis eines Prozesses ist, der entsprechend einen gewissen Zeitraum für seine Entwicklung benötigt.

#### ***4.4. Linksherzhypertrophie***

Die linksventrikuläre Hypertrophie und andere linksventrikuläre Veränderungen stellen bei Patienten mit einer progredienten chronischen Niereninsuffizienz eine der schwersten und häufig lebenslimitierenden Komplikationen dar. Bei Patienten im Endstadium der cNI sind kardiovaskuläre Komplikationen wie Herzinfarkt, Herzversagen und die Kardiomyopathie in 40% der Fälle die Todesursache<sup>24</sup>. Die linksventrikuläre Hypertrophie stellt die häufigste und früheste kardiale Komplikation und gleichzeitig einen unabhängigen Prognosefaktor für die kardiale Mortalität dar<sup>132,133</sup>.

Um eine bessere Vergleichbarkeit der Messwerte zu erreichen, wurde das linksventrikuläre Gewicht auf das Körpergewicht der Tiere bezogen. In unseren Versuchen zeigte sich eine deutlich geringere Zunahme des linksventrikulären Gewichtes, sowohl unter Therapie mit dem AT1-Antagonisten als auch dem Vasopeptidaseinhibitor, als auch ohne Therapie.

In verschiedenen anderen Untersuchungen ergaben sich ähnliche Ergebnisse. Mifsud et al. wiesen 2004 bei transgenen Ratten mit Überexpression des Ren2-Gens (TGR (mRen 2)27), die eine fulminante Hypertonie und schwere Organpathologien entwickeln, eine Dosisabhängigkeit der Wirkung von Omapatrilat auf die Herzhypertrophie nach<sup>108</sup>.

Eine Studie aus dem Jahre 2006 von Linz et al. zeigte bei SHR eine geringere Linksherzhypertrophie nach Therapie mit Ramipril ebenso wie bei Therapie mit AVE7688 im Vergleich zu Placebo<sup>105</sup>. Das linksventrikuläre Gewicht wurde wie in unserer Arbeit nach Dissektion der Ventrikel durch separates Wiegen bestimmt.

Eine andere Technik zur Bestimmung des linksventrikulären Gewichtes machten sich 2001 Dong et al. mit der Echokardiographie zunutze. Auch sie setzten das LV-Gewicht der SHR in Relation zum Körpergewicht und beobachteten eine deutliche Wirksamkeit sowohl von Omapatrilat als

auch eines ACE-Inhibitors. Insgesamt schrieben sie Omapatrilat einen potenteren Effekt auf die linksventrikuläre Masse und die Herzfunktion zu<sup>134</sup>. Die Ergebnisse weiterer Studien zeigt Tabelle 6.

Zusammenfassend kann von einer deutlichen Verringerung der postoperativen Linksherzhypertrophie durch den Vasopeptidaseinhibitor ausgegangen werden, wobei eine Aussage über die Stärke der Wirkung im Vergleich mit ACE-Hemmern und AT1-Antagonisten nicht eindeutig zu treffen ist. Prinzipiell ist ein direkter Vergleich wegen des Problems einer adäquaten Äquivalenzdosis immer nur eingeschränkt möglich. In der vorgelegten Arbeit haben Olmesartan und Omapatrilat den gleichen blutdrucksenkenden Effekt und werden deshalb als dosisäquivalent angesehen.

Studienbeleg	Tierstamm/ Modell	Behandlungs- dauer	Messsystem/ Einheit	CH ohne Ther.	CH mit VPI
Abassi, Yahia et al. 2005	Wistar, CHF by aortocaval fistula	16 Tage	HW/BW; %	0.51 +/- 0.026	0.41-0.43 (P < 0,01)
Burrell, Droogh et al. 2000	SHR	10 Tage	LVW/BW;mg /g KG	2.76 +/- 0.03	L: 2.71 +/- 0.02 mg/g H: 2.55 +/- 0.02 mg/g, (P < 0,01)
Burrell, Farina et al. 2000	myocardial infarction-induced congestive heart failure	4 weeks	LVW/BW; g/kg KG	2.53+/-0.1	2.33+/-0.04
Grönholm, Cheng et al. 2005	Goto-Kakizaki (GK) rat	12 Wochen			Verglichen mit Enalapril, reduzierte Omapatrilat das echocardiographisch gemessene LV Gewicht während Normalnatrium Diät; Omapatrilat reduzierte das relative Herzgewicht effektiver als Enalapril während Hochnatriumeinnahme
Lapointe, Blais et al. 2002	Wistar; Myocardial infarction	56 days	LVW/BW; mg/g	2.1+/-0.3 mg/g	1.6 to 1.7+/- 0.5, p < 0.05
Lapointe, Nguyen et al. 2003	Wistar; Myocardial infarction	37 days	LVW/BW; mg/g	1.94+/-0.06	1.64+/-0.03
Lassila, Davis et al. 2003	SHR with streptozotocin-induced diabetes	32 weeks	LVW/BW; mg/g	2.98	2.61 (p<0,05)
Loch, Hoey et al. 2006	Wistar, uninephrectomized	two weeks			Verminderte die Entwicklung von kardiovaskulärer Hypertrophie
Maki, Nasa et al. 2003	Wistar; Herzinsuff nach Koronararterienligatur	5 Wochen	HW/BW; mg/g	3.02 +/- 0.13	2.36 +/- 0.08 (p<0,05)
Nishikimi, Mori et al. 2006	Dahl salt-sensitive rats	7 weeks	LVW/BW; g/kg	3.17 +/- 0.32	2.55 +/- 0.12

**Tabelle 6: Weitere Studien zur Wirkung von VPI auf eine kardiale Hypertrophie.**

#### **4.5. Herzfibrosierung**

Das hypertoniebedingte Remodeling stellt einen bedeutenden Faktor zur Entwicklung einer Herzinsuffizienz dar. Um dieses Remodeling quantifizieren zu können, wurde eine histologische Aufarbeitung durchgeführt. Die histologische Auswertung der Herzen gliederte sich in die interstitielle und die perivaskuläre Fibrose. Auch bei diesen beiden Parametern lässt sich vier Wochen nach 5/6-Nephrektomie kein signifikanter Unterschied zwischen scheinoperierten Tieren der Gruppe Ko Sham und den unbehandelten nephrektomierten Tieren der Gruppe Nx belegen.

Die Untersuchungen der interstitiellen Fibrose ergaben insgesamt keinen Unterschied. Auch bei der perivaskulären linksventrikulären Fibrose ist ein Unterschied nach vier Wochen 5/6-Nx nicht nachweisbar. Die Gruppe AT1 zeigt eine deutliche Verringerung des bindegewebigen Umbaus verglichen mit den unbehandelten Tieren.

Eine gut vergleichbare Studie stammt von Nishikimi, Mori et al. Sie untersuchten an Dahl salzsensitiven Ratten die Fibrosefläche sowie die perivaskuläre Fibrose-Ratio. Hier zeigte sich nach siebenwöchiger Versuchsdauer eine deutlich verminderte interstitielle wie auch perivaskuläre kardiale Fibrose<sup>135</sup>.

Mit dem hypertonusassoziierten Remodeling befassten sich auch Pu und Schiffrin. Sie untersuchten den Effekt von Omapatrilat auf die Kollagenablagerung in Herz und Aorta. Zwanzig Wochen alte normotensive Wistar-Kyoto-Ratten wurden verglichen mit unbehandelten „Stroke-prone“ spontan hypertensiven Ratten (SHRSP) und mit Omapatrilat behandelten SHRSP. Nach 10 Wochen war sowohl die interstitielle als auch die perivaskuläre Fibrosierung deutlich zurückgegangen<sup>111</sup>.

Grönholm et al. wiesen in ihrer Studie an spontan hypertensiven Ratten mit salzreicher Diät nach acht Wochen eine stärkere Verringerung der myokardialen Kollagenvolumenfraktion durch den Vasopeptidaseinhibitor Omapatrilat nach, als diese durch AT1-Rezeptor-Blockade erreicht wurde<sup>97</sup>.

Weitere Studien zur kardiovaskulären Fibrose zeigt Tabelle 7.

Da sich weder bezüglich der interstitiellen, noch der perivaskulären Fibrosierung ein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen Ko Sham und Nx eingestellt hat, ist davon auszugehen, dass der vorliegende Versuchszeitraum zu kurz für die Ausbildung eines aussagekräftigen Phänotyps war. Wie in anderen Studien belegt ist, kann bei ausreichend langer Versuchsdauer von einer kardioprotektiven Wirkung einer Vasopeptidasehemmung ausgegangen werden.

Studienbeleg	Tierstamm/ Modell	Behandlungs- dauer	Messsystem/ Einheit	Fibrose ohne Therapie	Fibrose mit VPI
Bäcklund, Palojoki et al. 2003	Myocardial infarction	4 Wochen	Myocardiale Fibrose (%)	4.8+/-0.9	2.8+/-0.2%, (P,0.01)
Loch, Hoey et al. 2006					verminderte die Entwicklung von kardiovaskulärer Fibrose
Maki, Nasa et al. 2003	CHF following left coronary artery ligation	5 w	Collagen content (µg/mg Protein)	~40	~32 (P<0,05)
Mifsud, Burrell et al. 2004	m(Ren-2)27 rat	24 weeks.	Left ventricular collagen staining	5,6+/-1,5	L: 1,8+/-0,7 H: 0,9+/-0,2
Ye, Hodge et al. 2004	salt sensitive hypertension induced by treatment with L- NAME	4 weeks	Myokardiale Fibrose		Weniger als Kontrolle (P<0.0005)

**Tabelle 7: Weitere Studien zur Wirkung von VPI bei kardiovaskulärer Fibrose .**

## 5. Zusammenfassung

Die Vasopeptidaseinhibitoren stellen eine neue Substanzgruppe dar und kombinieren das Prinzip der klassischen ACE- Hemmung mit der Hemmung der Neutralen Endopeptidase (NEP) in einem Molekül.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die protektive Wirkung einer Vasopeptidasehemmung auf renale und kardiale Endorganschäden im Niereninsuffizienzmodell mit verminderter Nephronenanzahl zu untersuchen. Ratten mit operativ angelegter 5/6-Nephrektomie wurden vier Wochen lang mit dem Vasopeptidaseinhibitor Omapatrilat (AVE; 10 mg/kg KG/d) (n=21) oder dem AT1-Antagonisten Olmesartan (AT1; 36 mg/kg KG/d) behandelt (n=13) oder erhielten keine Therapie (Ko Sham; n=11).

Der systolische Blutdruck in der unbehandelten nephrektomierten Gruppe stieg deutlich um durchschnittlich 51 mmHg im Vergleich zur Kontrollgruppe Ko Sham, ebenso die Albuminurie (Ko Sham: 0,0+/-0,0 vs. Nx: 55,9+/-19,3 mg/24h,  $p<0,05$ ). In der AVE- und AT1-Gruppe lag der Blutdruck sowie die Albuminurie auf dem Niveau der unbehandelten Kontrollgruppe. Im Vergleich zur Kontrollgruppe fiel die Kreatininclearance nach Nephrektomie deutlich ab (2,76+/-0,17 vs. 0,87+/-0,19 ml/min,  $p<0,05$ ). AVE und Olmesartan hatten keinen Effekt (1,09+/-0,09 bzw. 1,17+/-0,11ml/min,  $p<0,05$ ). Der Glomeruloskleroseindex war unter AT1-Therapie erniedrigt im Vergleich zu Nx. Ohne Therapie steigert sich das linksventrikuläre Gewicht pro Körpergewicht nach Nx um ca. 58%, beide Therapiegruppen wiesen einen deutlich verminderten Anstieg um 10% (AT1,  $P<0,05$ ) bzw. 13% (AVE,  $P<0,05$ ) auf. Die morphometrische histologische Auswertung der kardialen Veränderungen ergab eine Reduktion der perivaskulären Fibrose nach Nx durch den AT1-Antagonisten. Die interstitielle Fibrosierung zeigte nach vier Wochen keine Unterschiede.

Die Veränderungen an Blutdruck, Albuminurie und linksventrikulärem Gewicht weisen deutlich auf eine nephro- sowie kardioprotektive Wirkung des Vasopeptidaseinhibitors hin. Da nach vierwöchiger Therapie auch in der unbehandelten 5/6-Nx-Gruppe kein ausgeprägter Phänotyp auftrat, bleibt es zukünftigen Untersuchungen vorbehalten, den Effekt eines Vasopeptidaseinhibitors auf die histologischen Strukturveränderungen am linken Ventrikel und an der Niere zu untersuchen.

## **Lebenslauf**

Mein Lebenslauf wird aus Gründen des Datenschutzes in der elektronischen Fassung meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

Katharina Schröder

## **Erklärung**

Ich, Katharina Schröder, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema: „Wirkung einer Vasopeptidasehemmung auf kardiale und renale Endorganschäden im 5/6-Nephrektomiemodell der Ratte“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe, dass ich die Arbeit ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Datum

Unterschrift

## Literaturverzeichnis

- <sup>1</sup> Whitworth, Judith A; World Health Organization, International Society of Hypertension Writing Group. 2003 World Health Organization (WHO)/International Society of Hypertension (ISH) statement on management of hypertension. *Journal of hypertension* 2003, 21 (11) 1983–1992. doi:10.1097/01.hjh.0000084751.37215.d2.
- <sup>2</sup> World Health Organization. *The World Health Report 2002: Risks to health 2002*, Geneva: World Health Organization, Ed., 2002.
- <sup>3</sup> Zanchetti, A.; Mancia, G. Structural cardiovascular adaptation and the consequences for baroreflexes. *Hypertension* 1984, 693–99.
- <sup>4</sup> Brenner, B. M. Nephron adaptation to renal injury or ablation. *The American journal of physiology* 1985, 249 (3) F324–337. <http://ajprenal.physiology.org/cgi/content/abstract/249/3/F324>.
- <sup>5</sup> *Integrated management of cardiovascular risk: report of a WHO meeting, Geneva, 9-12 July 2002.*, Shanthi Mendis, Ed.: World Health Organization, 2002.
- <sup>6</sup> Julius, S; Schork, M A. Predictors of hypertension. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1978, 30438–58.
- <sup>7</sup> Benigni, A.; Zoja, C.; Zatelli, C.; Corna, D.; Longaretti, L.; Rottoli, D.; Maggioni, P.; Todeschini, M.; Noris, M.; Remuzzi, G.; et al. Vasopeptidase inhibitor restores the balance of vasoactive hormones in progressive nephropathy. *Kidney international* 2004, 66 (5) 1959–1965. doi:10.1111/j.1523-1755.2004.00982.x.
- <sup>8</sup> Blaustein, M P; Hamlyn, J M. Pathogenesis of essential hypertension. A link between dietary salt and high blood pressure. *Hypertension* 1991, 18 (5 Suppl) III184-95.
- <sup>9</sup> Johnson, R J; Alpers, C E; Yoshimura, A; Lombardi, D; Pritzl, P; Floege, J; Schwartz, S M. Renal injury from angiotensin II-mediated hypertension. *Hypertension* 1992, 19 (5) 464–474.
- <sup>10</sup> Cowley, A W, Jr; Mattson, D L; Lu, S; Roman, R J. The renal medulla and hypertension. *Hypertension* 1995, 25 (4 Pt 2) 663–673.
- <sup>11</sup> Sealey, J E; Blumenfeld, J D; Bell, G M; Pecker, M S; Sommers, S C; Laragh, J H. On the renal basis for essential hypertension: nephron heterogeneity with discordant renin secretion and sodium excretion causing a hypertensive vasoconstriction-volume relationship. *Journal of hypertension* 1989, 6 (10) 763–777.
- <sup>12</sup> Guyton, A C; Coleman, T G; Cowley, A V, Jr; Scheel, K W; Manning, R D, Jr; Norman, R A, Jr. Arterial pressure regulation. Overriding dominance of the kidneys in long-term regulation and in hypertension. *The American journal of medicine* 1972, 52 (5) 584–594.
- <sup>13</sup> Lifton, R P. Molecular genetics of human blood pressure variation. *Science (New York, N.Y.)* 1996, 272 (5262) 676–680.
- <sup>14</sup> Kurokawa, K. Kidney, salt, and hypertension: how and why. *Kidney international. Supplement* 1996, 55S46-51.
- <sup>15</sup> Brenner, B. M.; Garcia, D. L.; Anderson, S. Glomeruli and blood pressure. Less of one, more the other? *American journal of hypertension* 1988, 1 (4 Pt 1) 335–347.
- <sup>16</sup> Mackenzie, H S; Lawler, E V; Brenner, B M. Congenital oligonephropathy: The fetal flaw in essential hypertension? *Kidney international. Supplement* 1996, 55S30-4.
- <sup>17</sup> Cowley, A W, Jr; Roman, R J. The role of the kidney in hypertension. *JAMA : the journal of the American Medical Association* 1996, 275 (20) 1581–1589.
- <sup>18</sup> Johnson, Richard J; Herrera-Acosta, Jaime; Schreiner, George F; Rodriguez-Iturbe, Bernardo. Subtle acquired renal injury as a mechanism of salt-sensitive hypertension. *The New England journal of medicine* 2002, 346 (12) 913–923. doi:10.1056/NEJMra011078.
- <sup>19</sup> Wright, Jackson T, Jr; Bakris, George; Greene, Tom; Agodoa, Larry Y; Appel, Lawrence J; Charleston, Jeanne; Cheek, DeAnna; Douglas-Baltimore, Janice G; Gassman, Jennifer; Glasscock, Richard; et al. Effect of blood pressure lowering and antihypertensive drug class on progression of hypertensive kidney disease: results from the AASK trial. *JAMA : the journal of the American Medical Association* 2002, 288 (19) 2421–2431.
- <sup>20</sup> Guyton, A C. Renal function curves and control of body fluids and arterial pressure. *Acta physiologica Scandinavica. Supplementum* 1990, 591107–113.
- <sup>21</sup> Bianchi, G; Fox, U; Di Francesco, G F; Giovanetti, A M; Pagetti, D. Blood pressure changes produced by kidney cross-transplantation between spontaneously hypertensive rats and normotensive rats. *Clinical science and molecular medicine* 1975, 47 (5) 435–448.
- <sup>22</sup> Curtis, J J; Luke, R G; Dustan, H P; Kashgarian, M; Whelchel, J D; Jones, P; Diethelm, A G. Remission of essential hypertension after renal transplantation. *The New England journal of medicine* 1983, 309 (17) 1009–1015.
- <sup>23</sup> Valderrábano, F; Gómez-Campderá, F; Jones, E H. Hypertension as cause of end-stage renal disease: lessons from international registries. *Kidney international. Supplement* 1999, 68S60-6.
- <sup>24</sup> *USRDS 1999 Annual Data Report*, US Renal Data System, Ed.: National Institutes of Health; National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases. Bethesda, 1999.
- <sup>25</sup> Innes, A; Johnston, P A; Morgan, A G; Davison, A M; Burden, R P. Clinical features of benign hypertensive nephrosclerosis at time of renal biopsy. *The Quarterly journal of medicine* 1993, 86 (4) 271–275.

- 
- <sup>26</sup> Churg J.; Sobin L.H. Benign Nephrosclerosis. In *Renal Disease- Classification and Atlas of Glomerular Diseases*. Tokio, 1982.
- <sup>27</sup> Caetano, E P; Zatz, R; Praxedes, J N. The clinical diagnosis of hypertensive nephrosclerosis--how reliable is it? *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association* 1999, 14 (2) 288–290.
- <sup>28</sup> Zucchelli, P; Zuccalà, A. Can we accurately diagnose nephrosclerosis? *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association* 1996, 10 Suppl 62–5.
- <sup>29</sup> Fogo, A; Breyer, J A; Smith, M C; Cleveland, W H; Agodoa, L; Kirk, K A; Glassock, R. Accuracy of the diagnosis of hypertensive nephrosclerosis in African Americans: a report from the African American Study of Kidney Disease (AASK) Trial. AASK Pilot Study Investigators. *Kidney international* 1997, 51 (1) 244–252.
- <sup>30</sup> Luke, R G. Hypertensive nephrosclerosis: pathogenesis and prevalence. Essential hypertension is an important cause of end-stage renal disease. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association* 1999, 14 (10) 2271–2278.
- <sup>31</sup> Regalado, M; Yang, S; Wesson, D E. Cigarette smoking is associated with augmented progression of renal insufficiency in severe essential hypertension. *American journal of kidney diseases : the official journal of the National Kidney Foundation* 2000, 35 (4) 687–694.
- <sup>32</sup> Perry, H M, Jr; Miller, J P; Fornoff, J R; Baty, J D; Sambhi, M P; Rutan, G; Moskowitz, D W; Carmody, S E. Early predictors of 15-year end-stage renal disease in hypertensive patients. *Hypertension* 1995, 25 (4 Pt 1) 587–594.
- <sup>33</sup> Chobanian, Aram V; Bakris, George L; Black, Henry R; Cushman, William C; Green, Lee A; Izzo, Joseph L, Jr; Jones, Daniel W; Materson, Barry J; Oparil, Suzanne; Wright, Jackson T, Jr; et al. The Seventh Report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure: the JNC 7 report. *JAMA : the journal of the American Medical Association* 2003, 289 (19) 2560–2572. doi:10.1001/jama.289.19.2560.
- <sup>34</sup> Anderson, S; Meyer, T W; Rennke, H G; Brenner, B M. Control of glomerular hypertension limits glomerular injury in rats with reduced renal mass. *The Journal of clinical investigation* 1985, 76 (2) 612–619.
- <sup>35</sup> Parving, H H; Oxenbøll, B; Svendsen, P A; Christiansen, J S; Andersen, A R. Early detection of patients at risk of developing diabetic nephropathy. A longitudinal study of urinary albumin excretion. *Acta endocrinologica* 1982, 100 (4) 550–555.
- <sup>36</sup> Parving, H H; Mogensen, C E; Jensen, H A; Evrin, P E. Increased urinary albumin-excretion rate in benign essential hypertension. *Lancet* 1974, 1 (7868) 1190–1192.
- <sup>37</sup> Bigazzi, R; Bianchi, S; Baldari, D; Campese, V M. Microalbuminuria predicts cardiovascular events and renal insufficiency in patients with essential hypertension. *Journal of hypertension* 1998, 16 (9) 1325–1333.
- <sup>38</sup> Bigazzi, R; Bianchi, S; Campese, V M; Baldari, G. Prevalence of microalbuminuria in a large population of patients with mild to moderate essential hypertension. *Nephron* 1992, 61 (1) 94–97.
- <sup>39</sup> Touyz, Rhian M. The role of angiotensin II in regulating vascular structural and functional changes in hypertension. *Current hypertension reports* 2003, 5 (2) 155–164.
- <sup>40</sup> Remuzzi, G; Bertani, T. Pathophysiology of progressive nephropathies. *The New England journal of medicine* 1998, 339 (20) 1448–1456.
- <sup>41</sup> Ruggenenti, P; Perna, A; Gherardi, G; Garini, G; Zoccali, C; Salvadori, M; Scolari, F; Schena, F P; Remuzzi, G. Renoprotective properties of ACE-inhibition in non-diabetic nephropathies with non-nephrotic proteinuria. *Lancet* 1999, 354 (9176) 359–364. doi:10.1016/S0140-6736(98)10363-X.
- <sup>42</sup> Brenner, B M; Cooper, M E; de Zeeuw, D; Keane, W F; Mitch, W E; Parving, H H; Remuzzi, G; Snapinn, S M; Zhang, Z; Shahinfar, S; et al. Effects of losartan on renal and cardiovascular outcomes in patients with type 2 diabetes and nephropathy. *The New England journal of medicine* 2001, 345 (12) 861–869.
- <sup>43</sup> Lewis, E J; Hunsicker, L G; Clarke, W R; Berl, T; Pohl, M A; Lewis, J B; Ritz, E; Atkins, R C; Rohde, R; Raz, I; et al. Renoprotective effect of the angiotensin-receptor antagonist irbesartan in patients with nephropathy due to type 2 diabetes. *The New England journal of medicine* 2001, 345 (12) 851–860.
- <sup>44</sup> Efficacy of atenolol and captopril in reducing risk of macrovascular and microvascular complications in type 2 diabetes: UKPDS 39. UK Prospective Diabetes Study Group. *BMJ (Clinical research ed.)* 1998, 317 (7160) 713–720.
- <sup>45</sup> Agodoa, L Y; Appel, L; Bakris, G L; Beck, G; Bourgoignie, J; Briggs, J P; Charleston, J; Cheek, D; Cleveland, W; Douglas, J G; et al. Effect of ramipril vs amlodipine on renal outcomes in hypertensive nephrosclerosis: a randomized controlled trial. *JAMA : the journal of the American Medical Association* 2001, 285 (21) 2719–2728.
- <sup>46</sup> de Simone, G; Devereux, R B; Roman, M J; Ganau, A; Saba, P S; Alderman, M H; Laragh, J H. Assessment of left ventricular function by the midwall fractional shortening/end-systolic stress relation in human hypertension. *Journal of the American College of Cardiology* 1994, 23 (6) 1444–1451.
- <sup>47</sup> Devereux, R B; de Simone, G; Ganau, A; Koren, M J; Mensah, G A; Roman, M J. Left ventricular hypertrophy and hypertension. *Clinical and experimental hypertension (New York, N.Y. : 1993)* 1994, 15 (6) 1025–1032.

- 
- <sup>48</sup> Swynghedauw, B. Molecular mechanisms of myocardial remodeling. *Physiological reviews* 1999, 79 (1) 215–262.
- <sup>49</sup> Kannel W.B. Hypertension and the risk of cardiovascular disease. In *Hypertension: pathophysiology, diagnosis and management*. Laragh J.H., Brenner, B. M., Eds. Raven Press: New York, 1990.
- <sup>50</sup> Frohlich, E D. Fibrosis and ischemia: the real risks in hypertensive heart disease. *American journal of hypertension : journal of the American Society of Hypertension* 2001, 14 (6 Pt 2) 194S-199S.
- <sup>51</sup> Pacifico, Antonio; Henry, Philip D. Structural pathways and prevention of heart failure and sudden death. *Journal of cardiovascular electrophysiology* 2003, 14 (7) 764–775.
- <sup>52</sup> Weber, K T; Brilla, C G. Pathological hypertrophy and cardiac interstitium. Fibrosis and renin-angiotensin-aldosterone system. *Circulation* 1991, 83 (6) 1849–1865.
- <sup>53</sup> Stockand, James D; Meszaros, J Gary. Aldosterone stimulates proliferation of cardiac fibroblasts by activating Ki-RasA and MAPK1/2 signaling. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology* 2002, 284 (1) H176-84. doi:10.1152/ajpheart.00421.2002.
- <sup>54</sup> Rudic, R D; Shesely, E G; Maeda, N; Smithies, O; Segal, S S; Sessa, W C. Direct evidence for the importance of endothelium-derived nitric oxide in vascular remodeling. *The Journal of clinical investigation* 1998, 101 (4) 731–736.
- <sup>55</sup> Lin, M; Sumimoto, T; Hiwada, K. Left ventricular geometry and cardiac function in mild to moderate essential hypertension. *Hypertension research : official journal of the Japanese Society of Hypertension* 1995, 18 (2) 151–157.
- <sup>56</sup> MacMahon, S W; Wilcken, D E; Macdonald, G J. The effect of weight reduction on left ventricular mass. A randomized controlled trial in young, overweight hypertensive patients. *The New England journal of medicine* 1986, 314 (6) 334–339.
- <sup>57</sup> Neaton, J D; Grimm, R H, Jr; Prineas, R J; Stamler, J; Grandits, G A; Elmer, P J; Cutler, J A; Flack, J M; Schoenberger, J A; McDonald, R; et al. Treatment of Mild Hypertension Study. Final results. Treatment of Mild Hypertension Study Research Group. *JAMA : the journal of the American Medical Association* 1993, 270 (6) 713–724.
- <sup>58</sup> Cruickshank, J M; Lewis, J; Moore, V; Dodd, C. Reversibility of left ventricular hypertrophy by differing types of antihypertensive therapy. *Journal of human hypertension* 1992, 6 (2) 85–90.
- <sup>59</sup> Jennings, G; Wong, J. Regression of left ventricular hypertrophy in hypertension: changing patterns with successive meta-analyses. *Journal of hypertension. Supplement : official journal of the International Society of Hypertension* 1999, 16 (6) S29-34.
- <sup>60</sup> Pitt, B; Poole-Wilson, P A; Segal, R; Martinez, F A; Dickstein, K; Camm, A J; Konstam, M A; Riegger, G; Klingler, G H; Neaton, J; et al. Effect of losartan compared with captopril on mortality in patients with symptomatic heart failure: randomised trial--the Losartan Heart Failure Survival Study ELITE II. *Lancet* 2000, 355 (9215) 1582–1587.
- <sup>61</sup> Tedesco, M A; Ratti, G; Aquino, D; Limongelli, G; di Salvo, G; Mennella, S; Galzerano, D; Iarussi, D; Iacono, A. Effects of losartan on hypertension and left ventricular mass: a long-term study. *Journal of human hypertension* 1998, 12 (8) 505–510.
- <sup>62</sup> Thürmann, P A; Kenedi, P; Schmidt, A; Harder, S; Rietbrock, N. Influence of the angiotensin II antagonist valsartan on left ventricular hypertrophy in patients with essential hypertension. *Circulation* 1998, 98 (19) 2037–2042.
- <sup>63</sup> Dahlöf, Björn; Devereux, Richard B; Kjeldsen, Sverre E; Julius, Stevo; Beevers, Gareth; de Faire, Ulf; Fyhrquist, Frej; Ibsen, Hans; Kristiansson, Krister; Lederballe-Pedersen, Ole; et al. Cardiovascular morbidity and mortality in the Losartan Intervention For Endpoint reduction in hypertension study (LIFE): a randomised trial against atenolol. *Lancet* 2002, 359 (9311) 995–1003.
- <sup>64</sup> Lüscher, T F. Possibilities and perspectives of pharmacotherapy for endothelial protection. *Current opinion in nephrology and hypertension* 1994, 2 (1) 129–136.
- <sup>65</sup> Moncada, S; Vane, J R. Pharmacology and endogenous roles of prostaglandin endoperoxides, thromboxane A<sub>2</sub>, and prostacyclin. *Pharmacological reviews* 1980, 30 (3) 293–331.
- <sup>66</sup> Vanhoutte, P M. Endothelium-derived free radicals: for worse and for better. *The Journal of clinical investigation* 2001, 107 (1) 23–25.
- <sup>67</sup> Heagerty, A M; Aalkjaer, C; Bund, S J; Korsgaard, N; Mulvany, M J. Small artery structure in hypertension. Dual processes of remodeling and growth. *Hypertension* 1993, 21 (4) 391–397.
- <sup>68</sup> Rizzoni, D; Porteri, E; Castellano, M; Bettoni, G; Muiesan, M L; Muiesan, P; Giulini, S M; Agabiti-Rosei, E. Vascular hypertrophy and remodeling in secondary hypertension. *Hypertension* 1996, 28 (5) 785–790.
- <sup>69</sup> Schiffrin, E L; Deng, L Y; Larochelle, P. Progressive improvement in the structure of resistance arteries of hypertensive patients after 2 years of treatment with an angiotensin I-converting enzyme inhibitor. Comparison with effects of a beta-blocker. *American journal of hypertension : journal of the American Society of Hypertension* 1995, 8 (3) 229–236.

- <sup>70</sup> Morgan, K. Diverse factors influencing angiotensin metabolism during ACE inhibition: insights from molecular biology and genetic studies. *British heart journal* 1994, 72 (3 Suppl) S3-10.
- <sup>71</sup> Zisman, L S; Abraham, W T; Meixell, G E; Vamvakias, B N; Quaife, R A; Lowes, B D; Roden, R L; Peacock, S J; Groves, B M; Raynolds, M V; et al. Angiotensin II formation in the intact human heart. Predominance of the angiotensin-converting enzyme pathway. *The Journal of clinical investigation* 1995, 96 (3) 1490–1498.
- <sup>72</sup> Peters, J. Molecular basis of human hypertension: the role of angiotensin. *Baillière's clinical endocrinology and metabolism* 1995, 9 (3) 657–678.
- <sup>73</sup> Benigni, A; Perico, N; Remuzzi, G. Research on renal endothelin in proteinuric nephropathies dictates novel strategies to prevent progression. *Current opinion in nephrology and hypertension* 2001, 10 (1) 1–6.
- <sup>74</sup> Remuzzi, G; Bertani, T. Is glomerulosclerosis a consequence of altered glomerular permeability to macromolecules? *Kidney international* 1990, 38 (3) 384–394.
- <sup>75</sup> Anderson, S; Rennke, H G; Brenner, B M. Therapeutic advantage of converting enzyme inhibitors in arresting progressive renal disease associated with systemic hypertension in the rat. *The Journal of clinical investigation* 1986, 77 (6) 1993–2000.
- <sup>76</sup> Dostal, D E; Baker, K M. The cardiac renin-angiotensin system: conceptual, or a regulator of cardiac function? *Circulation research* 1999, 85 (7) 643–650.
- <sup>77</sup> Erdös, E G; Skidgel, R A. Neutral endopeptidase 24.11 (enkephalinase) and related regulators of peptide hormones. *The FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 1989, 3 (2) 145–151.
- <sup>78</sup> Iwata, N; Tsubuki, S; Takaki, Y; Shirotani, K; Lu, B; Gerard, N P; Gerard, C; Hama, E; Lee, H J; Saido, T C; et al. Metabolic regulation of brain Abeta by neprilysin. *Science (New York, N.Y.)* 2001, 292 (5521) 1550–1552. doi:10.1126/science.1059946.
- <sup>79</sup> Jeng, Arco Y; Savage, Paula; Beil, Michael E; Bruseo, Charles W; Hoyer, Denton; Fink, Cynthia A; Trapani, Angelo J. CGS 34226, a thiol-based dual inhibitor of endothelin converting enzyme-1 and neutral endopeptidase 24.11. *Clinical science (London, England : 1979)* 2002, 103 Suppl 4898S-101S. doi:10.1042/CS103S098S.
- <sup>80</sup> Oliver, P M; Fox, J E; Kim, R; Rockman, H A; Kim, H S; Reddick, R L; Pandey, K N; Milgram, S L; Smithies, O; Maeda, N; et al. Hypertension, cardiac hypertrophy, and sudden death in mice lacking natriuretic peptide receptor A. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1998, 94 (26) 14730–14735.
- <sup>81</sup> Dendorfer A. Was leisten die Vasopeptidase-Inhibitoren? *Cardiovasc* 2002, 2 (3) 38–42.
- <sup>82</sup> Stasch, J P; Hirth-Dietrich, C; Ganten, D; Wegner, M. Renal and antihypertensive effects of neutral endopeptidase inhibition in transgenic rats with an extra renin gene. *American journal of hypertension : journal of the American Society of Hypertension* 1997, 9 (8) 795–802.
- <sup>83</sup> Favrat, B; Burnier, M; Nussberger, J; Lecomte, J M; Brouard, R; Waeber, B; Brunner, H R. Neutral endopeptidase versus angiotensin converting enzyme inhibition in essential hypertension. *Journal of hypertension* 1995, 13 (7) 797–804.
- <sup>84</sup> Coats, A. J. Omapatrilat--the story of Overture and Octave. *International journal of cardiology* 2002;11, 86 (1) 1–4.
- <sup>85</sup> Raij, L; Azar, S; Keane, W. Mesangial immune injury, hypertension, and progressive glomerular damage in Dahl rats. *Kidney international* 1985, 26 (2) 137–143.
- <sup>86</sup> Wolf, G; Butzmann, U.; Wenzel, U. O. The Renin-Angiotensin System and Progression of Renal Disease: From Hemodynamics to Cell Biology. *Nephron Physiol* 2003, 93 (1) p3-p13.
- <sup>87</sup> Taal, M W; Brenner, B M. ACE-I vs angiotensin II receptor antagonists: prevention of renal injury in chronic rat models. *Journal of human hypertension* 1999, 13 Suppl 1S51-6; discussion S61.
- <sup>88</sup> Brenner, B. M.; Anderson, S. The interrelationships among filtration surface area, blood pressure, and chronic renal disease. *Journal of cardiovascular pharmacology* 1992, 19 Suppl 6S1-7.
- <sup>89</sup> Abassi, Z. A.; Yahia, A.; Zeid, S.; Karram, T.; Golomb, E.; Winaver, J.; Hoffman, A. Cardiac and renal effects of omapatrilat, a vasopeptidase inhibitor, in rats with experimental congestive heart failure. *American journal of physiology* 2005, 288 (2) H722-8. doi:10.1152/ajpheart.00737.2004
- <sup>90</sup> Burrell, L. M.; Droogh, J.; Man, in't Veld O.; Rockell, M. D.; Farina, N. K.; Johnston, C. I. Antihypertensive and antihypertrophic effects of omapatrilat in SHR. *American journal of hypertension* 2000, 13 (10) 1110–1116.
- <sup>91</sup> Cao, Z.; Burrell, L. M.; Tikkanen, I.; Bonnet, F.; Cooper, M. E.; Gilbert, R. E. Vasopeptidase inhibition attenuates the progression of renal injury in subtotal nephrectomized rats. *Kidney international* 2001, 60 (2) 715–721. doi:10.1046/j.1523-1755.2001.060002715.x
- <sup>92</sup> Cheng, Zhong Jian; Grönholm, Tina; Louhelainen, Marjut; Finckenberg, Piet; Merasto, Saara; Tikkanen, Ilkka; Mervaala, Eero. Vascular and renal effects of vasopeptidase inhibition and angiotensin-converting enzyme blockade in spontaneously diabetic Goto-Kakizaki rats. *Journal of hypertension* 2005, 23 (9) 1757–1770.
- <sup>93</sup> Davis, B. J.; Johnston, C. I.; Burrell, L. M.; Burns, W. C.; Kubota, E.; Cao, Z.; Cooper, M. E.; Allen, T. J. Renoprotective effects of vasopeptidase inhibition in an experimental model of diabetic nephropathy. *Diabetologia* 2003, 46 (7) 961–971. doi:10.1007/s00125-003-1121-9.

- <sup>94</sup> d'Uscio, L. V.; Quaschnig, T.; Burnett, J. rC.J.; Lüscher, T. F. Vasopeptidase Inhibition Prevents Endothelial Dysfunction of Resistance Arteries in Salt-Sensitive Hypertension in Comparison With Single ACE Inhibition. *Hypertension* 2001, 37 (1) 28–33.
- <sup>95</sup> Ferrario, C. M.; Averill, D. B.; Brosnihan, K. B.; Chappell, M. C.; Iskandar, S. S.; Dean, R. H.; Diz, D. I. Vasopeptidase inhibition and Ang-(1-7) in the spontaneously hypertensive rat. *Kidney international* 2002, 62 (4) 1349–1357. doi:10.1111/j.1523-1755.2002.kid559.x.
- <sup>96</sup> Fredersdorf, Sabine; Weil, Joachim; Ulucan, Coskun; Birner, Christoph; Büttner, Roland; Schubert, Thomas; Böger, Carsten A.; Debl, Kurt; Muders, Frank; Riegger, Günter A.; et al. Vasopeptidase inhibition attenuates proteinuria and podocyte injury in Zucker diabetic fatty rats. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology* 2007, 375 (2) 95–103. doi:10.1007/s00210-007-0147-9.
- <sup>97</sup> Gröholm, Tina; Finckenberg, Piet; Palojoki, Eeva; Saraste, Antti; Bäcklund, Tom; Eriksson, Anders; Laine, Mika; Mervaala, Eero; Tikkanen, Ilkka. Cardioprotective effects of vasopeptidase inhibition vs. angiotensin type 1-receptor blockade in spontaneously hypertensive rats on a high salt diet. *Hypertension research : official journal of the Japanese Society of Hypertension* 2004, 27 (8) 609–618
- <sup>98</sup> Grönholm, T.; Cheng, Z. J.; Palojoki, E.; Eriksson, A.; Bäcklund, T.; Vuolteenaho, O.; Finckenberg, P.; Laine, M.; Mervaala, E.; Tikkanen, I.; et al. Vasopeptidase inhibition has beneficial cardiac effects in spontaneously diabetic Goto-Kakizaki rats. *European journal of pharmacology* 2005, 519 (3) 267–276. doi:10.1016/j.ejphar.2005.07.015
- <sup>99</sup> Intengan, H. D.; Schiffrin, E. L. Vasopeptidase inhibition has potent effects on blood pressure and resistance arteries in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* 2000, 35 (6) 1221–1225.
- <sup>100</sup> Ishimura, K.; Nishikimi, T.; Akimoto, K.; Ono, H.; Kangawa, K.; Matsuoka, H. Renoprotective effect of long-term combined treatment with adrenomedullin and omapatrilat in hypertensive rats. *Journal of hypertension* 2005, 23 (12) 2287–2296
- <sup>101</sup> Krebs, C.; Hamming, I.; Sadaghiani, S.; Steinmetz, O. M.; Meyer-Schwesinger, C.; Fehr, S.; Stahl, R. A.; Garrelts, I. M.; Danser, A. H.; van Goor, H.; et al. Antihypertensive therapy upregulates renin and (pro)renin receptor in the clipped kidney of Goldblatt hypertensive rats. *Kidney international* 2007, 72 (6) 725–730. doi:10.1038/sj.ki.5002408.
- <sup>102</sup> Lapointe, Nathalie; Nguyen, Quang Trinh; Desjardins, Jean-François; Marcotte, Francois; Pourdjabbar, Ali; Moe, Gordon; Calderone, Angelino; Rouleau, Jean-Lucien. Effects of pre-, peri-, and postmyocardial infarction treatment with omapatrilat in rats: survival, arrhythmias, ventricular function, and remodeling. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology* 2003, 285 (1) H398-405. doi:10.1152/ajpheart.01144.2002.
- <sup>103</sup> Lassila, Markus; Davis, Belinda J.; Allen, Terri J.; Burrell, Louise M.; Cooper, Mark E.; Cao, Zemin. Cardiovascular hypertrophy in diabetic spontaneously hypertensive rats: optimizing blockade of the renin-angiotensin system. *Clinical science (London, England : 1979)* 2003, 104 (4) 341–347. doi:10.1042/
- <sup>104</sup> Laverman, Gozewijn D.; Van Goor, Harry; Henning, Robert H.; De Jong, Paul E.; de Zeeuw, Dick; Navis, Gerjan. Renoprotective effects of VPI versus ACEI in normotensive nephrotic rats on different sodium intakes. *Kidney international* 2003, 63 (1) 64–71. doi:10.1046/j.1523-1755.2003.00708.x.
- <sup>105</sup> Linz, W.; Schäfer, S.; Afkham, F.; Gerl, M.; Schmidts, H. L.; Rütten, H. Vasopeptidase inhibition prevents target organ damage and improves survival in spontaneously hypertensive rats. *Journal of the renin-angiotensin-aldosterone system* 2006, 7 (3) 155–161. doi:10.3317/jraas.2006.025
- <sup>106</sup> Loch, D.; Hoey, A.; Brown, L. Attenuation of cardiovascular remodeling in DOCA-salt rats by the vasopeptidase inhibitor, omapatrilat. *Clinical and experimental hypertension* 2006, 28 (5) 475–488. doi:10.1080/10641960600798754
- <sup>107</sup> Maki, T.; Nasa, Y.; Tanonaka, K.; Takahashi, M.; Takeo, S. Direct inhibition of neutral endopeptidase in vasopeptidase inhibitor-mediated amelioration of cardiac remodeling in rats with chronic heart failure. *Molecular and cellular biochemistry* 2003, 254 (1-2) 265–273.
- <sup>108</sup> Mifsud, Sally A; Burrell, Louise M; Kubota, Eiji; Jaworski, Kassie; Cooper, Mark E; Wilkinson-Berka, Jennifer L. Cardiorenal protective effects of vasopeptidase inhibition with omapatrilat in hypertensive transgenic (mREN-2)27 rats. *Clinical and experimental hypertension (New York, N.Y. : 1993)* 2004, 26 (1) 69–80.
- <sup>109</sup> Morazo, P.; Fortepiani, L. A.; Clara, Ortíz M.; Atucha, N. M.; García-Estañ, J. Omapatrilat normalizes renal function curve in spontaneously hypertensive rats. *BMC pharmacology* 2001, 15.
- <sup>110</sup> Nishikimi, T.; Mori, Y.; Ishimura, K.; Ishikawa, Y.; Koshikawa, S.; Akimoto, K.; Minamino, N.; Kangawa, K.; Matsuoka, H. Chronic effect of combined treatment with omapatrilat and adrenomedullin on the progression of heart failure in rats. *American journal of hypertension* 2006, 19 (10) 1039–1048. doi:10.1016/j.amjhyper.2006.02.013
- <sup>111</sup> Pu, Q.; Schiffrin, E. L. Effect of ACE/NEP inhibition on cardiac and vascular collagen in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *American journal of hypertension* 2001, 14 (10) 1067–1072.

- 112 Quaschnig, T.; d'Uscio, L. V.; Shaw, S.; Viswambharan, H.; Ruschitzka, F. T.; Lüscher, T. F. Chronic vasopeptidase inhibition restores endothelin-converting enzyme activity and normalizes endothelin levels in salt-induced hypertension. *Nephrology, dialysis, transplantation* 2001, 16 (6) 1176–1182.
- 113 Quaschnig, T.; Hocher, B.; Ruhl, S.; Kraemer-Guth, A.; Tilgner, J.; Wanner, C.; Galle, J. Vasopeptidase inhibition normalizes blood pressure and restores endothelial function in renovascular hypertension. *Kidney & blood pressure research* 2006, 29 (6) 351–359. doi:10.1159/000097625.
- 114 Raasch, W.; Dominiak, P.; Dendorfer, A. Angiotensin I-converting enzyme-dependent and neutral endopeptidase-dependent generation and degradation of angiotensin II contrarily modulate noradrenaline release: implications for vasopeptidase-inhibitor therapy? *Journal of hypertension* 2005, 23 (8) 1597–1604.
- 115 Steinmetz, O. M.; Sadaghiani, S.; Panzer, U.; Krebs, C.; Meyer-Schwesinger, C.; Streichert, T.; Fehr, S.; Hamming, I.; van Goor, H.; Stahl, R. A.; et al. Antihypertensive therapy induces compartment-specific chemokine expression and a Th1 immune response in the clipped kidney of Goldblatt hypertensive rats. *American journal of physiology. Renal physiology* 2007, 292 (2) F876-87. doi:10.1152/ajprenal.00174.2006.
- 116 Taal, M. W.; Nenov, V. D.; Wong, W.; Satyal, S. R.; Sakharova, O.; Choi, J. H.; Troy, J. L.; Brenner, B. M. Vasopeptidase inhibition affords greater renoprotection than angiotensin-converting enzyme inhibition alone. *Journal of the American Society of Nephrology* 2001, 12 (10) 2051–2059.
- 117 Wang, T.; Takabatake, T. Effects of vasopeptidase inhibition on renal function and tubuloglomerular feedback in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension research* 2005, 28 (7) 611–618.
- 118 Windt, W. A.; Eijkelkamp, W. B.; Henning, R. H.; Kluppel, A. C.; de Graeff P. A.; Hillege, H. L.; Schäfer, S.; Zeeuw, D. de; van, Dokkum R P. Renal damage after myocardial infarction is prevented by renin-angiotensin-aldosterone-system intervention. *Journal of the American Society of Nephrology* 2006, 17 (11) 3059–3066. doi:10.1681/ASN.2006030209.
- 119 Wong, Victor; Szeto, Linda; Uffelmann, Kristine; Fantus, I. George; Lewis, Gary F. Enhancement of muscle glucose uptake by the vasopeptidase inhibitor, omapatrilat, is independent of insulin signaling and the AMP kinase pathway. *The Journal of endocrinology* 2006, 190 (2) 441–450. doi:10.1677/joe.1.06396.
- 120 Ye, V. Z.; Hodge, G.; Yong, J. L.; Duggan, K. A. Vasopeptidase inhibition reverses myocardial vasoactive intestinal peptide depletion and decreases fibrosis in salt sensitive hypertension. *European journal of pharmacology* 2004, 485 (1-3) 235–242.
- 121 Ying, Lu; Flamant, Martin; Vandermeersch, Sophie; Boffa, Jean-Jacques; Chatziantoniou, Christos; Dussaule, Jean-Claude; Chansel, Dominique. Renal effects of omapatrilat and captopril in salt-loaded, nitric oxide-deficient rats. *Hypertension* 2003, 42 (5) 937–944. doi:10.1161/01.HYP.0000099240.89890.94.
- 122 Amann K, Wanner C, Ritz E. Cross-talk between the kidney and the cardiovascular system. *J Am Soc Nephrol.* 2006 Aug;17:2112-9.
- 123 Cuspidi C, Ciulla M, Zanchetti A. Hypertensive myocardial fibrosis. *Nephrol Dial Transplant.* 2006 Jan;21:20-3.
- 124 Wang, Tao; Takabatake, Toshikazu. Effects of vasopeptidase inhibition on renal function and tubuloglomerular feedback in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension research : official journal of the Japanese Society of Hypertension* 2005, 28 (7) 611–618.
- 125 Wenzel, Ulrich O.; Wolf, Gunter; Jacob, Ivonne; Schwegler, Christian; Qasqas, Arish; Amann, Kerstin; Helmchen, Udo; Stahl, Rolf A. Beneficial and adverse renal and vascular effects of the vasopeptidase inhibitor omapatrilat in renovascular hypertensive rats. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association* 2003, 18 (10) 2005–2013. doi:10.1093/ndt/gfg271.
- 126 Wolf, G.; Wenzel, U. O.; Dominiak, P.; Neumayer, H. H. Hemmung der Progression von chronischen Nierenerkrankungen. Therapie durch Blockierung des Renin-Angiotensin-Systems. *Deutsches Ärzteblatt* 20030804, 100 (31-32) A-2072. <AHREF="http://www.aerzteblatt.de/v4/archiv/artikel.asp?src=dimdi&id=37920"target="\_blank">http://www.aerzteblatt.de/v4/archiv/artikel.asp?src=dimdi&id=37920.
- 127 Nakhoul, Farid; Ramadan, Rawi; Khankin, Eliyahu; Yaccob, Afif; Kositch, Zoya; Lewin, Moshe; Assady, Suheir; Abassi, Zaid. Glomerular abundance of nephrin and podocin in experimental nephrotic syndrome: different effects of antiproteinuric therapies. *American journal of physiology. Renal physiology* 2005, 289 (4) F880-90. doi:10.1152/ajprenal.00451.2004.
- 128 Schäfer, S.; Linz, W.; Bube, A.; Gerl, M.; Huber, J.; Kürzel, G. U.; Bleich, M.; Schmidts, H. L.; Busch, A. E.; Rütten, H.; et al. Vasopeptidase inhibition prevents nephropathy in Zucker diabetic fatty rats. *Cardiovascular research* 2003, 60 (2) 447–454.
- 129 Schäfer, Stefan; Schmidts, Hans-Ludwig; Bleich, Markus; Busch, Andreas E.; Linz, Wolfgang. Nephroprotection in Zucker diabetic fatty rats by vasopeptidase inhibition is partly bradykinin B2 receptor dependent. *British journal of pharmacology* 2004, 143 (1) 27–32. doi:10.1038/sj.bjp.0705884.

- 
- <sup>130</sup> Wihler, C.; Schäfer, S.; Schmid, K.; Deemer, E. K.; Münch, G.; Bleich, M.; Busch, A. E.; Dingermann, T.; Somoza, V.; Baynes, J. W.; et al. Renal accumulation and clearance of advanced glycation end-products in type 2 diabetic nephropathy: effect of angiotensin-converting enzyme and vasopeptidase inhibition. *Diabetologia* 2005, 48 (8) 1645–1653. doi:10.1007/s00125-005-1837-9.
- <sup>131</sup> Miller, P. L.; Rennke, H. G.; Meyer, T. W. Glomerular hypertrophy accelerates hypertensive glomerular injury in rats. *The American journal of physiology* 1991, 261 (3 Pt 2) F459-65.
- <sup>132</sup> Paoletti E, Bellino D, Cassottana P, Rolla D, Cannella G. Left ventricular hypertrophy in nondiabetic predialysis CKD. *Am J Kidney Dis.* 2005 Aug;46:320-7.
- <sup>133</sup> Silberberg JS, Barre PE, Prichard SS, Sniderman AD. Impact of left ventricular hypertrophy on survival in end-stage renal disease. *Kidney Int.* 1989 Aug;36:286-90.
- <sup>134</sup> Dong, Y.; Zhou, H.; Shaffer, E.; Atamas, N.; Liao, W. C.; Wei, C. The cardiovascular actions of omapatrilat in spontaneously hypertensive rats. *Current hypertension reports* 2001, 3 Suppl 2S1-5.
- <sup>135</sup> Nishikimi, Toshio; Mori, Yosuke; Ishimura, Kimihiko; Ishikawa, Yayoi; Koshikawa, Shogo; Akimoto, Kazumi; Minamino, Naoto; Kangawa, Kenji; Matsuoka, Hiroaki. Chronic effect of combined treatment with omapatrilat and adrenomedullin on the progression of heart failure in rats. *American journal of hypertension : journal of the American Society of Hypertension* 2006, 19 (10) 1039–1048. doi:10.1016/j.amjhyper.2006.02.013.